

**Kopplung von Retinolsäure an einen anti-Neuroblastom-
Antikörper und Testung des Immunkonjugates als
Differenzierungsinduktor
- In vitro und in vivo Untersuchungen -**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Conny Schlick
geboren am 22.05.1975 in Karl-Marx-Stadt

Gutachter

- 1: Prof. Dr. Felix Zintl
- 2: Dr. Alexander Berndt
- 3: Prof. Dr. Frank Berthold

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14. Juni 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	4
2	Zusammenfassung	5
3	Einleitung	8
3.1	Neuroblastom	8
3.2	Retinolsäure	12
3.3	Monoklonale Antikörper	16
3.4	In vivo-Tumormodelle	20
4	Ziele der Arbeit	22
5	Material und Methoden	23
5.1	Chemikalien	23
5.2	Monoklonale Antikörper für Untersuchungen	23
5.3	Zellkultur	25
5.4	Laborgeräte	25
5.5	Materialien	26
5.6	Monoklonale Antikörper für die Immunkonjugation	26
5.7	Retinolsäure	27
5.8	Konjugation von Retinolsäure und einem monoklonalen Antikörper	28
5.8.1	Mediator	28
5.8.2	Vorbereitung des Antikörpers	28
5.8.3	Vorbereitung der Retinolsäure	29
5.8.4	Kopplung	29
5.8.5	Vorbereitung des Konjugates für die Versuche	31
5.9	In vitro-Testung der Konjugate	32
5.9.1	Konzentrationsbestimmung	32
5.9.2	Bindungsfähigkeit der Konjugate	36
5.9.3	Beeinflussung des Zellwachstums	37
5.10	Versuchstiere	38
5.11	Etablierung eines SCID-Maus-Tumor-Modells	39
5.11.1	Tumorzellen	39
5.11.2	Modelletablierung	39

5.12	In vivo-Experimente	41
5.12.1	Letale Dosis der all- <i>trans</i> -Retinolsäure	41
5.12.2	Beeinflussung des Tumorwachstums durch Immunkonjugate	42
5.12.3	Postmortale Untersuchung der Versuchstiere.....	42
5.12.4	Beeinflussung der Überlebenszeit durch Immunkonjugate.....	43
5.12.5	Immunzytologische Färbung.....	44
5.13	Statistische Auswertung.....	45
6	Ergebnisse	46
6.1	Konjugation von Retinolsäure und einem monoklonalen Antikörper	46
6.2	In vitro-Testung der Konjugate	49
6.2.1	Konzentrationsbestimmung	49
6.2.2	Bindungsfähigkeit der Konjugate	51
6.2.3	Beeinflussung des Zellwachstums	53
6.3	Etablierung eines SCID-Maus-Tumor-Modells	55
6.4	Therapeutische Versuche / In vivo-Experimente.....	58
6.4.1	Letale Dosis der all- <i>trans</i> -Retinolsäure	58
6.4.2	Beeinflussung des Tumorwachstums durch Immunkonjugate	59
6.4.3	Postmortale Untersuchung der Versuchstiere.....	63
6.4.4	Beeinflussung der Überlebenszeit durch Immunkonjugate.....	67
7	Diskussion.....	68
7.1	Konjugation von Retinolsäure und einem monoklonalen Antikörper	68
7.2	In vitro-Testung der Konjugate	70
7.2.1	Konzentrationsbestimmung	70
7.2.2	Bindungsfähigkeit der Konjugate	72
7.2.3	Beeinflussung des Zellwachstums	73
7.3	Etablierung eines SCID-Maus-Tumor-Modells	75
7.4	In vivo-Experimente	76
8	Schlußfolgerungen	81
9	Literatur	83
10	Abbildungsverzeichnis	92
11	Tabellenverzeichnis.....	93
12	Anhang	94

1 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Monoklonaler Antikörper
APAAP	Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase
BSA	Bovines Serumalbumin
CRABP	Cellular Retinoic Acid Binding Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FKS	Fötales Kälberserum
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IGF-R	Insulin-like Growth Factor Receptor
MES	2-(N-Morpholino)-Ethan-Sulfonsäure
MTT-Test	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-Diphenyltetrazolium-Test
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NF 68	Neurofilament 68
NGF-R	Nerve Growth Factor Receptor
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
RA	all- <i>trans</i> -Retinolsäure
RAR	Retinoic Acid Receptor
RXR	Retinoid X Receptor
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
TGF-R	Transforming Growth Factor Receptor
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid

2 Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist das häufigste extrakranielle Malignom im Kindesalter. Die Fünfjahresüberlebensrate beträgt bei kombinierter operativer, Radio- und Chemotherapie 67 %. Vor allem jenseits des ersten Lebensjahres treten Tumoren auf, die bereits bei Diagnosestellung weit fortgeschritten und trotz intensiver Therapie mit einer ungünstigen Prognose verbunden sind.

Andererseits ist das Auftreten spontaner Regression über den Weg der Ausdifferenzierung oder der Apoptose eine für das Neuroblastom typische Eigenschaft. Seit 1982 ist bekannt, dass Retinolsäure, die sich bereits bei der Therapie der promyelozytischen Leukämie bewährt hat, die Differenzierung von Neuroblastomzellen und damit die Tumorregression bewirken kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte durch die Kopplung von all-*trans*-Retinolsäure an den monoklonalen anti-Neuroblastom-Antikörper 15/7 erreicht werden, dass über dieses Immunkonjugat die Retinolsäure direkt an ihren Wirkort zur Tumorzelle transportiert wird und somit effektiver und mit geringeren unerwünschten Wirkungen auf gesundes Gewebe ihre Funktion als Differenzierungsinduktor ausüben kann.

Die Kopplung erfolgte über die Carbodiimid-Methode mittels des Mediators 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC). Nach Optimierung der Kopplungsreaktion und der nachfolgenden Trennung der ungekoppelten Retinolsäure vom Immunkonjugat konnte in einem Zell-ELISA gezeigt werden, dass die Bindungsfähigkeit des Antikörpers an die Neuroblastomzelllinie SK-N-MC durch die Kopplung nicht beeinträchtigt wird.

Im 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-Diphenyltetrazolium-Test (MTT-Test) fand sich nach Inkubation von Kulturen der SK-N-MC-Zellen mit dem Immunkonjugat eine signifikant verminderte Proliferation der Zellkultur (47 % proliferierende Zellen) im Vergleich zur ungekoppelten Retinolsäure (RA, 80 %)

oder dem Antikörper allein (Ak, 89 %) sowie dem Gemisch beider Substanzen (Ak+RA, 79 %), wie auch zum Zellkulturmedium (100 %) und dem als Lösungsmittel der Retinolsäure dienenden Ethanol (100 %).

Um die wachstumshemmende und differenzierungsfördernde Wirkung des Immunkonjugates auch in vivo untersuchen zu können, wurde ein SCID-Maus-Tumormodell etabliert, das dem natürlichen Phänomen der Metastasierung möglichst nahekommt. Zu diesem Zweck wurden sechs bis acht Wochen alten SCID-Mäusen jeweils 2×10^7 Zellen der permanenten Neuroblastomzelllinie SK-N-MC zur Hälfte intravenös und intraperitoneal injiziert.

Beginnend am zweiten bis dritten Tag nach Tumorzellapplikation wurden den Versuchstieren die Immunkonjugatlösung sowie die Kontrolllösungen (RA, Ak, Ak+RA, NaCl) insgesamt sechsmal im Abstand von zwei bis drei Tagen intraperitoneal appliziert. Die Tumormasse je Versuchstier war am niedrigsten nach Konjugatapplikation (0,32 g), signifikant erniedrigt gegenüber RA (1,66 g) jedoch nicht gegenüber Ak+RA (1,50 g), Ak (1,71 g), oder NaCl (1,79 g). Die Tumorzahl je Versuchstier nach Konjugatapplikation (3,5) war niedriger als nach Behandlung mit den einzelnen Substanzen RA (6,0), Ak (5,0) oder NaCl (6,0) und geringfügig größer als nach Behandlung mit Ak+RA (3,0), wobei signifikante Unterschiede gegenüber NaCl und RA auftraten. Das Überleben der Versuchstiere konnte durch die Behandlung mit dem Immunkonjugat nicht verlängert werden.

Für eine stärkere Zelldifferenzierung der konjugatbehandelten Tumoren im Vergleich zu kochsalzbehandelten Tumoren sprach im immunzytologischen alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase-Test (APAAP-Test) die vermehrte Nachweisbarkeit der für die Differenzierung relevanten Adhäsionsmoleküle ICAM und NCAM, des Wachstumsfaktorrezeptors TGF-R und des Schwannzellmarkers GFAP sowie in der Histochemie der stärkere Nachweis der Schwannzellmarker GFAP und S100 sowie des für Neuronen spezifischen Intermediärfilaments Alpha1-Internexin.

Die Kopplung von all-*trans*-Retinolsäure an den monoklonalen Antikörper 15/7 gelang erfolgreich. Die Funktionalität des Antikörpers wurde dadurch nicht beeinträchtigt. Das Wachstum einer Neuroblastom-Zellkultur konnte eindrucksvoll gehemmt werden. In vivo-Tests ergaben die niedrigste Tumormasse und eine stärkere Reifung der Tumorzellen nach Konjugatbehandlung. Die Überlebensdauer konnte durch die Konjugatbehandlung nicht signifikant verbessert werden.

Die vielversprechenden Ergebnisse insbesondere der in vitro-Versuche rechtfertigen weitere Optimierungsschritte auf dem Weg zum klinischen Einsatz des Immunkonjugates.

3 Einleitung

3.1 Neuroblastom

Vielfältigste Faktoren steuern Wachstum und Differenzierung unserer Körperzellen. Dazu zählen unter anderem genetische Informationen. Sind sie fehlerhaft, kann die für eine maligne Erkrankung typische unkontrollierte Zellteilung in Gang kommen. Bei Kindern stehen Malignome als Todesursache nach Unfällen an zweiter Stelle. Von 100 000 Kindern unter 15 Jahren erkranken jährlich -13 bis 14 an Krebs. Die Heilungsrate insgesamt beträgt bei Kindern etwa 70 % (Schön et al., 1999).

Das histopathologische Erscheinungsbild des Neuroblastoms wurde erstmals 1864 durch R. L. K. Virchow beschrieben und der Begriff Neuroblastom 1910 von J. H. Wright geprägt (Evans, 2000).

Das Neuroblastom ist nach Leukämien und bösartigen Hirntumoren die dritthäufigste maligne Erkrankung bei Kindern (Matthay, 1995) und in dieser Altersgruppe für 8 % der Krebserkrankungen (Mora et al., 2001) und für 15 % der Krebstodesfälle verantwortlich (Matthay, 1997). Insgesamt konnte in den vergangenen zwanzig Jahren das Fünfjahresüberleben von Kindern mit einem Neuroblastom von 48 % auf 67 % angehoben werden (Berthold und Hero, 2000).

Das mediane Alter bei Diagnosestellung ist der 22. Lebensmonat (Castleberry, 1997). Vor dem fünften Lebensjahr werden bereits 90 % aller Neuroblastome diagnostiziert. Der Primärtumor ist in 65 % der Fälle ein abdomineller Tumor. Die hämatogene Ausbreitung kann in das Knochenmark, in das Skelettsystem, Leber, Haut, seltener in die Lungen oder das Gehirn erfolgen.

Die Ätiologie des Neuroblastoms ist letztendlich unklar. Es wird als embryonaler Tumor angesehen, der sich während des fetalen oder frühen postnatalen Lebens aus Zellen der Neuralleiste entwickelt, die noch unreif oder dedifferenziert sind (Mora et al., 2001).

Es gibt zumindest drei klinische Muster des Neuroblastoms. Diese sind die disseminierte Erkrankung, die ohne medizinische Intervention spontan zurückgehen kann (International Neuroblastoma Staging System INSS Stadium 4S), der örtlich begrenzte Tumor, der lokal rezidivieren kann aber nicht in Knochen oder Knochenmark metastasiert (INSS Stadium 1, 2, 3) und die metastasierte Erkrankung, die auf eine zytostatische Therapie anspricht aber häufig mit letalen Komplikationen wiederkehrt (INSS Stadium 4). Bei Diagnosestellung befinden sich über 50 % der Patienten im Stadium 4, das Überleben liegt dann bei Patienten über einem Jahr um 20 % (Mora et al., 2001).

Die Einteilung der Neuroblastomerkrankungen in Therapiegruppen erfolgt nach den biologischen Merkmalen Alter bei Diagnose, klinisches Stadium, Status der MYCN-Amplifikation, histopathologischer Befund und DNA-Ploidität. In erster Linie aus Alter bei Diagnose, MYCN-Status und INSS-Stadium resultieren die Risikogruppen Beobachtungspatienten, Standardrisikopatienten und Hochrisikopatienten. Bei niedrigem Risiko ist es das Ziel, die für eine Langzeitheilung erforderliche Therapie so weit wie möglich zu reduzieren, um unerwünschte Nebenwirkungen der Therapie und Langzeitfolgen möglichst gering zu halten. Bei hohem Risiko wird nach einer Hochdosischemotherapie eine Stammzelltransplantation durchgeführt. In dieser Gruppe befinden sich nach fünf Jahren 25-40 % der Patienten in kompletter Remission.

Mittlerweile wird in neuen Therapieempfehlungen der Einsatz der 13-*cis*-Retinolsäure bei Residualtumorzellbefall nach intensiver Therapie und zur Konsolidierungstherapie empfohlen. Studienergebnisse zeigten einen Anstieg des ereignisfreien Überlebens nach drei Jahren durch die Therapie mit 13-*cis*-Retinolsäure nach initialer Chemo- und Radiotherapie und anschließender Knochenmarktransplantation oder nach Chemotherapie von 29 % auf 46 %. Die deutlichsten Erfolge mit 13-*cis*-Retinolsäure konnten bei minimaler Restkrankheit (MRD, minimal residual disease) mit kompletter Remission nach initialer Chemotherapie erzielt werden (Matthay et al., 1999).

Aufgrund ihres aggressiven Verhaltens besitzen 60 % der Neuroblastomerkrankungen eine schlechte Prognose. Typisch für die übrigen 40 %, in denen das klinische Verhalten des Tumors günstiger ist, sind Involution, spontane Regression oder Maturation des Tumors.

Die biologisch günstigeren Tumoren treten meist im Laufe des ersten Lebensjahres auf, so dass inzwischen von mindestens zwei differenten biologischen Untergruppen von Neuroblastomen ausgegangen wird, für die verschiedene genetische und molekulare Marker existieren. Tumorsuppressorgene wurden zum Beispiel auf den Chromosomen 1 und 17 gefunden, bei vermehrtem Vorhandensein dieser genetischen Information im Sinne einer Hyperploidie der DNA resultiert bei jüngeren Kindern eine günstigere Prognose. Ein zuverlässiger Marker aggressiven klinischen Verhaltens ist die genomische Amplifikation und dadurch Aktivierung des MYCN-Proto-Onkogens, die bei 20 bis 25 % der Neuroblastome zu finden ist (Maris, Matthay, 1999). Eine vermehrte Expression des NGF-Rezeptors (Nerve Growth Factor Receptor) hingegen wird bei klinisch günstigeren Verläufen gefunden.

Beim Neuroblastom sind einige biochemische Marker in Serum und Urin charakteristischerweise erhöht. Dazu zählen unter anderem die Katecholaminmetaboliten Homovanillinmandelsäure (HVA) und Vanillinmandelsäure (VMA), das Neuro-peptid Y, das vasoaktive intestinale Peptid, die neuronenspezifische Enolase und Ferritin.

Da der Tumor zwar insgesamt selten aber unter Säuglingen die häufigste maligne Erkrankung ist, liegt die Frage nach einer Möglichkeit der Früherkennung auf der Hand. Bei dem auf der Grundlage der Bestimmung von HVA und VMA im Urin vielerorts durchgeführten Screening bei Säuglingen im Alter von bis zu einem Jahr wurden Tumoren mit meist günstigen Eigenschaften entdeckt. Da jedoch die Prävalenz des Neuroblastoms in der gescreenten Population nahezu zweimal so hoch wie die der ungescreenten Population war, wurden offenbar auch Tumoren erfaßt, die sonst einer spontanen Regression verfallen wären. Da zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen einem günstigen und potentiell lebensbedrohlichen Verlauf nicht unterschieden werden konnte, ist die Folge automatisch eine Übertherapie. Ein generelles Screening wird aus diesen Gründen zur Zeit nicht unterstützt (Shimada, Nakagawa, 1999; Schilling et al., 2002).

Trotz häufiger dramatischer Verläufe hat das Neuroblastom die höchste Rate spontaner Regression unter allen Tumoren und kann selbst bei Metastasierung zu einem gutartigen Ganglioneurom reifen.

Ein sogenanntes Neuroblastoma in situ, also eine (noch) nicht invasive Form, wird unabhängig von der Todesursache bei Obduktionen vierzigmal häufiger gefunden als ein klinisch detektierbarer Tumor. Seitdem dieses Wissen bekannt wurde, konnten bei nahezu allen verstorbenen Feten Foci derartiger Zellreste nachgewiesen werden (Castleberry, 1997). Als einer der potentesten Induktoren für Reifung und Differenzierung bis zu einem Ganglioneurom wurde in vitro die Retinolsäure (RA) beschrieben (Reynolds et al., 1991). Das Ganglioneurom bezeichnet neben Neuroblastom, Ganglioneuroblastom und nodulärem Ganglioneuroblastom eine der vier Kategorien, in die neuroblastische Tumoren histopathologisch eingeteilt werden können. Als Zeichen der Maturierung ist eine Zunahme des Anteils der Schwannzellen typisch (Shimada et al., 1999b). Der immunhistochemische Nachweis der Oberflächenantigene GFAP und S100 ist ein Weg Schwannzellen zu charakterisieren.

Eine weitere Möglichkeit, den Reifegrad eines Neuroblastoms zu beschreiben, ist der Nachweis zellulärer Adhäsionsmoleküle (Cellular Adhesion Molecules CAM). Sie sind in die Zelladhäsion und Immunerkennung involviert und werden auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen exprimiert. Bei Neuroblastomen niedrigeren Stadiums oder höherer Differenzierung wird die Expression verschiedener CAMs hochreguliert, insbesondere Inter Cellular Adhesion Molecule (ICAM-1) (Gross et al., 1992). Der Nachweis der Expression geschieht zum Beispiel über die alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase-Technik (APAAP-Technik). Sie ist eine etablierte Methode bei der Färbung humaner Gewebeantigene (Cordell et al., 1984). Dass die Expression einzelner Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktorrezeptoren auf der Zelloberfläche von Neuroblastomzellen der Linie SK-N-MC nach Inkubation mit *all-trans*-Retinolsäure deutlich ansteigt, wurde für ICAM, NCAM, PECAM, VCAM und IGF-R gezeigt. Ebenfalls vermehrt exprimiert war NF68, während die Expression von NGF und TGF-R etwa unverändert blieb (Voigt et al., 2000).

3.2 Retinolsäure

Seit Beginn des 19. Jahrhunderts war Vitamin A als ein wichtiger Nahrungsbestandteil und seine bedeutsame Rolle beim Sehzyklus bekannt. Bei einem Vitamin A-Mangel in der Schwangerschaft wurden Fehlbildungen beobachtet. Da diese Fehlbildungen durch Gabe von Retinolsäure verhindert werden konnten, wurde Retinolsäure als die biologisch aktive Form des Vitamin A angenommen (Rohwedel et al., 1999). Als solche ist sie für die Vermittlung und Aufrechterhaltung zellulärer Differenzierung erforderlich. Bei Säugetieren kommen endogen sowohl all-*trans*- als auch 13-*cis*-Retinolsäure vor (Blaner, 1993).

Von Petkovich et. al und von Giguere et al. wurde 1987 der erste Retinoidrezeptor beschrieben, der heute als Retinoic Acid Receptor alpha (RAR-alpha) bekannt ist. Inzwischen wurden sechs weitere gut beschrieben, die entweder all-*trans*-Retinolsäure oder deren Metaboliten 9-*cis*-Retinolsäure binden und über ein kompliziertes Wirkungsmuster zur Kontrolle spezifischer Genexpression verfügen.

Retinolsäurerezeptoren als hochaffine ligandinduzierte Transkriptionsfaktoren gehören wie Steroid- und Schilddrüsenhormonrezeptoren zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren (Noy, 2000). Es werden die Retinolsäurerezeptoren RAR alpha, beta, gamma und Retinoid X Receptor (RXR) alpha, beta und gamma unterschieden. RAR binden all-*trans*-Retinolsäure mit hoher Affinität, 9-*cis*-Retinolsäure wird sowohl von RAR als auch von RXR gebunden. Wie andere Mitglieder der Steroidhormonrezeptorfamilie verfügen RAR und RXR über eine ligandbindende und eine DNA-bindende Domäne. Nachdem Retinolsäure an den nukleären Rezeptor gebunden ist, bilden sich homo- oder heterodimere Komplexe (Evans, Kaye, 1999). Diese Komplexe binden an sogenannte Retinoid Response Elements RARE in der Promotorregion des Targetgens, was eine höhere oder niedrigere Transkription zur Folge hat (Hansen et al., 2000). RAR und RXR spielen im Signalweg verschiedene Rollen, die Genexpression nach Einwirkung von 9-*cis*- und all-*trans*-Retinolsäure führte in vitro zu verschiedenen Resultaten (Lovat et al., 2001).

Die Aktivierung der Retinolsäurerezeptoren kann zu einer Hemmung der Zellproliferation führen und Differenzierung oder Apoptose induzieren. Diese Vorgänge wurden in mesenchymalen, neuroektodermalen, hämatopoetischen und epithelialen Zellen sowohl während der normalen Entwicklung als auch in normalen und transformierten Zellen in der Zellkultur beobachtet. Synthetische neue Retinoide sind zum Beispiel 4HPR, der RAR-selektive Ligand ALRT1550 und der RXR-selektive Ligand LGD1069. Mittels dieser Substanzen könnten die Signalwege genauer indentifiziert werden und sich neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen (Evans, Kaye, 1999).

In vivo kommt Retinolsäure entweder gebunden an Zellmembranen oder an speziellen retinoidbindenden Proteinen vor und wird vermutlich durch zelluläre retinoidbindende Proteine in den Zellkern transportiert. Die intrazellulär und im Nukleus vorkommenden Moleküle Cellular Retinoic Acid Binding Protein CRABP-I und -II lösen und stabilisieren ihre hydrophoben und labilen Liganden im wäßrigen Raum. Ihre Funktion ist wahrscheinlich nicht nur die Bindung sondern auch die Regulation von Transport, Metabolismus und Wirkung der Retinolsäure. Es wurde beschrieben, dass CRABP-I die Aktivität von Enzymen moduliert, die die metabolische Transformation von Retinolsäure katalysieren. CRABP-I scheint die zelluläre Reaktion auf Retinolsäure abzdämpfen. CRABP-II transportiert Retinolsäure direkt an RAR. Die Expression von CRABP-II scheint Zellen auf Retinolsäure zu sensibilisieren (Noy, 2000). CRABP-I und II sind hoch konservierte Moleküle. Bei einem übermäßigen Angebot an Retinolsäure wurden Embryopathien beobachtet, es traten Fehlbildungen der Neuralrohrstrukturen, Herzfehler und Thymusabnormalitäten auf. Dass in Tiermodellen sehr ähnliche Muster auftraten, verdeutlicht den essentiellen und bedeutenden Mechanismus in der Entwicklung (Berry, 1997).

Retinoide erfordern eine spezielle Handhabung, Aufbewahrung und Analyse. Die natürlich vorkommenden Retinoide besitzen fünf oder mehr konjugierte Doppelbindungen und werden so durch Luftsauerstoff leicht angegriffen, durch Licht isomerisiert sowie durch Hitze in biologisch weniger oder inaktive Komponenten umgesetzt.

All-*trans*-Retinolsäure ($C_{20}H_{28}O_2$) hat ein Molekulargewicht von 300,4 g/mol. Sie ist extrem empfindlich gegenüber ultravioletter Strahlung, Luft und oxidierenden Substanzen.

Unter Lichteinwirkung kommt es zu einer Photoisomerisation, die umso ausgeprägter ist, je niedriger die Konzentration der Retinolsäurelösung ist. In einer 10^{-5} M Lösung betrug die Photoisomerisation nach 30 min 100 %. Der biologische Effekt der Isomerisation zu 9-*cis*-, 11-*cis*-, 13-*cis*- und 9,13-di-*cis*-Retinolsäure wurde an embryonalen Karzinomzellen untersucht. Im Vergleich zu all-*trans*-Retinolsäure lag die Aktivität, die Differenzierung von Karzinomzellen zu induzieren, von 9-*cis*-, 11-*cis*- und 13-*cis*-Retinolsäure bei 1/10, die der 9,13-di-*cis*-Retinolsäure bei 1/100 (Murayama et al., 1997).

Retinolsäure ist in Wasser praktisch nicht sondern nur in organischen Lösungsmitteln löslich. In DMSO ist Retinolsäure bis 40 mg/ml löslich, in 95%igem Ethanol bis 2,7 mg/ml. Eine Vorratslösung von 0,01 M Retinolsäure (3 mg/ml) in absolutem Ethanol kann bis zu zwei Wochen bei -70°C aufbewahrt werden (Sigma Product Information Sheet).

Die maximale Lichtabsorption von in Ethanol gelöster all-*trans*-Retinolsäure liegt bei 340 nm. Die Absorptionsspektroskopie ist eine gute Methode zur Quantifizierung von Retinolsäure-Konzentrationen in Lösungen.

Retinoide sind erstklassige Kandidaten für die Chemoprävention von Krebs, da sie Zellproliferation und -differenzierung regulieren und Krebs mit einem gestörten Wachstum und einem Verlust der Differenzierung verbunden ist (Moon et al., 1994).

Bei der Regeneration von Nerven spielt Retinolsäure eine Rolle als Transkriptionsregulator. Gliazellen produzieren Retinolsäure, diese interagiert mit Zytokinsignalen, die zelluläre Interaktionen nach einer Nervenläsion vermitteln. In vitro konnte gezeigt werden, wie Retinolsäure die axonale Regeneration verstärkt. Während der Entwicklung werden gliale und neuronale Differenzierung durch endogene Retinolsäure gefördert (Mey, 2001).

Eine verstärkte Aufnahme von Retinol (Vitamin A) über die Nahrung erhöht jedoch nicht die Retinolsäurekonzentration im Organismus sondern führt zur Ansammlung von Retinylestern in der Leber. Deshalb ist die direkte Zufuhr von Retinolsäure für therapeutische und Präventionszwecke erforderlich.

Bei Vitamin A-defizienten Tieren bewirkte die Substitution mit Retinolsäure eine Hautkrebsprävention (Hansen et al., 2000). In klinischen Studien zeigte Retinolsäure nicht nur eine Wirkung bei der Unterdrückung präkanzeröser Läsionen der Haut sondern inhibierte auch sekundäre Hautkrebsentstehung bei Xeroderma pigmentosum sowie nach operativer oder Radiotherapie von Karzinomen im Kopf- und Halsbereich (Lippman, Lotan, 2000).

Retinoide verhielten sich bei Mammakarzinomen synergistisch mit Tamoxifen als Inhibitoren des Wachstums von östrogenrezeptorpositiven Zellen (Yang et al., 1999) und erreichen bei der akuten promyelozytischen Leukämie (APL) in Kombination mit Chemotherapie ein besseres Überleben (Fenaux et al., 2001).

In vitro wurde 1982 erstmals die Differenzierung von Neuroblastomzellen durch Retinolsäure gezeigt (Sidell, 1982). Bei manchen Neuroblastomzellen zeigen sich nach Einwirkung von all-*trans*-, 9-*cis*- oder 13-*cis*-Retinolsäure tiefgreifende morphologische Veränderungen wie ausgeprägte Neuritenbildung und reduziertes Zellwachstum. Gleichzeitig wird die Synthese von neurospezifischen Enzymen wie Acetylcholinesterase und von Neurotransmittern wie Katecholaminen erhöht. Die Expression entsprechender Zelladhäsionsmoleküle (CAM), die bei Zell-Zell-Interaktionen während Wachstum und Differenzierung eine Rolle spielen, verändert sich ebenfalls (Voigt et al., 2000).

Es wurden multiple unerwünschte Arzneimittelwirkungen der Retinolsäure beschrieben. Dosislimitierend waren unter anderem Hyperkalzämie, Exantheme, Übelkeit, Anämie, Thrombozytopenie, die nach Beendigung der Therapie sistierten. Mit 58–89 % erlebten die meisten Patienten eine gewisse Hauttoxizität. Dazu zählen trockene oder schuppige Haut, Cheilitis, Konjunktivitis und erythematöse makulopapulöse bis bullöse Effloreszenzen. Gastrointestinale Symptome wie Diarrhoe, Erbrechen, Übelkeit, Bauchschmerzen und Anorexie traten ebenfalls auf (Villablanca et al., 1995). Pseudotumor cerebri wurde vor allem bei pädiatrischen Patienten beobachtet. All-*trans*-Retinolsäure wirkt darüberhinaus stark teratogen (Dimery, 1993).

3.3 Monoklonale Antikörper

Antikörper sind Proteine, die mit ihren Antigenbindungsstellen eine spezifische Bindung mit Zielstrukturen, den Epitopen, eingehen können. Die Bildung und Freisetzung von Antikörpern erfolgt durch Plasmazellen, die aus B-Lymphozyten hervorgehen. Antikörper sind aus einem variablen Fab-Teil und einem konstanten Fc-Teil aufgebaut. Die Eigenschaft eines Antikörpers, an spezifische Epitope zu binden, wird durch die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen im variablen Anteil realisiert. Für den Fc-Teil besitzen andererseits viele Zellen Rezeptoren, worüber die Effektorfunktion des Antikörpers vermittelt wird.

Monoklonale Antikörper sind uniforme Immunglobulinmoleküle, die von einem einzigen B-Zell-Klon abstammen und denselben Antigenbereich erkennen (Nelson et al., 2000). Deren Herstellung für den umfangreichen Einsatz in Klinik und Forschung ist möglich seit der Einführung der Hybridomtechnik durch Köhler und Milstein (1975). Dazu werden Mäuse mit dem entsprechenden Antigen immunisiert und die entstandenen B-Zellen isoliert. Diese B-Lymphozyten werden durch Fusionierung mit Kulturlinien von Myelomzellen unsterblich und produzieren langfristig den jeweiligen monoklonalen Antikörper. Inzwischen können monoklonale Antikörper auch durch rekombinante Produktion mittels Phagen gewonnen werden (Breedveld, 2000).

Diagnostisch können monoklonale Antikörper in der Onkologie eingesetzt werden, um Gewebe und Tumoren histopathologisch zu klassifizieren und um Tumormarker nachzuweisen und dadurch zum Beispiel die Prognose abzuschätzen (Nelson et al., 2000).

Eine Möglichkeit der therapeutischen Anwendung monoklonaler Antikörper ist die Inhibierung allo- und autoimmuner Reaktivität. Der Anti-CD3-Antikörper Muromonab wird zur Prävention der Transplantatabstoßung nach Nierentransplantation genutzt. Infliximab, ein anti-TNF-Antikörper, wird bei ausgeprägten Verlaufsformen von Morbus Crohn und Rheumatoidarthritis eingesetzt. In Studien wurde Abciximab als Inhibitor der Plättchenaggregation untersucht. Palivizumab wird in der Prophylaxe der Infektion mit RSV, dem Respiratory Syncytial Virus, bei Kindern mit definierten Risikofaktoren angewandt (Breedveld, 2000).

Die Immuntherapie ist mittlerweile eine vierte Therapiemodalität in der Onkologie neben operativer, Radio- und Chemotherapie. Durch die hochspezifische Bindung besteht dabei ein recht großes potentiell therapeutisches Fenster mit maximalen Antitumoreffekten und limitierter Toxizität für den Wirt. Die Unterschiede zwischen Antigenen auf Tumorzellen und normalen Zellen sind dabei eher quantitativer als qualitativer Art. Der ideale spezifische Antikörper sollte alle Tumorlokalisationen erreichen, einschließlich der Metastasen, ohne die große Masse der wachsenden und sich differenzierenden normalen Zellen anzugreifen (Bodey et al., 2000). Antikörper können dabei genutzt werden für die direkte Modulation der Tumorfunktion, zur Förderung der Tumorlyse durch Immuneffektorzellen und als regelrechte „Geschosse“ (magic bullets) beladen mit Radionukliden, Toxinen oder Chemotherapeutika.

Rituximab als nichtkonjugierter monoklonaler Antikörper wird zum Beispiel beim Non-Hodgin-Lymphom mit dem Ziel eingesetzt, eine biologische Antitumorantwort auszulösen. Anfang des Jahres 2002 wurde Zevalin, ein radionuklidgebundener monoklonaler Antikörper, für die Therapie von Non-Hodgin-Lymphomen zugelassen (Gura, 2002). Außerdem wird die Einsatzmöglichkeit von monoklonalen Antikörpern bei der Therapie von Melanomen, Brustkrebs und Kolonkarzinomen untersucht.

Das Gangliosid GD2 ist ein Antigen, das auf der Oberfläche humaner Neuroblastomzellen stark exprimiert ist. Monoklonale Anti-GD2-Antikörper werden in der Neuroblastomtherapie eingesetzt. Einer dieser Antikörper, ch14.18, ist ein chimeres Konstrukt, das heißt, er besitzt murine variable Regionen und humane konstante Regionen. Dadurch sind die antigenbindenden Eigenschaften vergleichbar zu murinen monoklonalen Antikörpern und die physikalischen und komplement- und Fc-Rezeptorbindenden Eigenschaften vergleichbar denen humaner Immunglobulinketten. Seine Verträglichkeit wurde in einer Phase-I-Studie bei minimaler Restkrankheit nach Neuroblastomtherapie gezeigt (Ozkaynak et al., 2000). Für murine monoklonale Antikörper wie 14G2a konnte in Phase-I- und -II-Studien die Fähigkeit, Tumorzellen im Knochenmark abzutöten, demonstriert werden. Die Wirkung auf eine größere Tumormasse war weniger deutlich (Brodeur, 2000).

Für zielspezifische zytotoxische Prozesse werden mittlerweile Immunkonjugate untersucht. Dazu werden Antikörper gekoppelt an hochletale Zellgifte wie das Pflanzengift Ricin und das bakteriell abgeleitete Pseudomonasexotoxin, außerdem an konventionelle Chemotherapeutika wie Doxorubicin oder Calicheamicin oder an Radionuklide wie Jod 131 oder Yttrium 90 (Weiner, 1999). Konkrete Studien wurden bereits bei malignen Melanomen, Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom und ALL mit Ricin A-gekoppelten monoklonalen Antikörpern durchgeführt, außerdem mit pseudomonastoxingekoppelten Antikörpern bei Adulter T-Zell-Leukämie.

Ein muriner monoklonaler Antikörper, der unter anderem die Neuroblastomzelllinie SK-N-MC spezifisch erkennt, ist der Antikörper 15/7. Er konnte nach der Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit einer Mischung der humanen Neuroblastomzelllinien CHP 134, SK-N-FI, SK-N-AS, SK-N-LO, SK-N-MC, SK-PN-DW und IMR 5 isoliert und mittels der Hybridomtechnik produziert werden. Der monoklonale Antikörper 15/7 gehört der Immunglobulinsubklasse IgG2b an. Seine Bindungsrate an Tumorzellen der Linie SK-N-MC lag bei 90 %. Sowohl zu den meisten Organen und Geweben als auch zu anderen malignen Tumoren wurde keine Kreuzreaktivität gefunden. Lediglich Perineurium und interstitielles Bindegewebe zeigten ebenfalls eine deutliche Reaktion (Voigt et al., 1993). Jod 131 wurde an den monoklonalen Antikörper 15/7 gekoppelt und die Verteilung in neuroblastomtragenden SCID-Mäusen untersucht. Die Tumoren aus SK-N-MC-Zellen wuchsen subkutan, der radioaktiv markierte Antikörper wurde intraperitoneal injiziert. Im Vergleich zu anderen Geweben war die Anreicherung des Antikörpers im Tumor 9,5fach (Voigt et al., 1997).

Trotz potentieller Einsatzmöglichkeiten in Diagnostik und Therapie gibt es bei der Therapie mit monoklonalen Antikörpern Hindernisse. Der Antikörper gelangt nur begrenzt an den Tumor und wird im Tumorgewebe nicht immer homogen verteilt. Darüberhinaus können zytotoxische und immunmodulatorische Zellen oft nicht den kompletten Tumor durchdringen. Nicht nur in der Zellkultur, auch in vivo besitzt die Oberfläche der Tumorzellen eine deutliche Antigenheterogenität. Nicht zuletzt ist Tumorthherapie mit murinen monoklonalen Antikörpern limitiert durch die Induktion von humanen Anti-Maus-Antikörpern (Weiner, 1999).

Zur Kopplung von Retinolsäure an den monoklonalen Antikörper 15/7 wurde EDC benutzt. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (hier in Form von $C_8H_{17}N_3 \times HCl$ = Carbodiimidhydrochlorid eingesetzt) ist ein wasserlösliches Derivat von Carbodiimid.

Carbodiimid katalysiert die Bildung einer Amidbindung zwischen Carboxylsäuren (hier Retinolsäure) oder Phosphaten und Aminen (hier Antikörper als Protein) durch Aktivierung von Carboxylgruppen oder Phosphaten zur Bildung von O-N-Derivaten. Diese Derivate reagieren bereitwillig mit nukleophilen Substanzen. Carbodiimid kann genutzt werden zur Bildung von Etherbindungen von Alkoholgruppen und Esterbindungen von Säuren und Alkoholen oder Phenolen sowie zur Bildung von Peptidbindungen zwischen Säuren und Aminen. Carbodiimid wird oft für die Peptidsynthese genutzt als wasserlösliches Derivat EDC oder als in organischen Lösungsmitteln lösliches Derivat N,N'-dicyclohexylcarbodiimid (DCC). Außerdem ist die EDC-Kopplung eine etablierte Methode in der Synthese von Biomaterialien. So machen Kollagen-Glykosaminoglykane, die durch EDC-Kopplung vernetzt wurden, Studien zur Herstellung künstlichen Gelenkknorpels möglich (Lee et al., 2001). Die Kreuzvernetzung von Kollagen und Elastin verbesserte die Resistenz der so entstandenen Matrix gegenüber enzymatischem Abbau, die als Komponente artifiziellen Hautersatzes einsetzbar sein könnte (Hafemann et al., 2001).

Eine weitere Einsatzmöglichkeit der EDC-Kopplung in der Synthese von Biomaterialien sind Dacron-Gefäßprothesen, an deren Oberfläche kovalent über EDC-Kopplung rekombinantes Hirudin gebunden wurde, um die Thrombogenität der Oberfläche zu senken und das Entstehen einer zellulären Neointima zu fördern (Wyers et al., 1999).

Darüberhinaus spielt die EDC-Kopplung eine wichtige Rolle in der Impfstoffentwicklung. Die Kopplung von Pertussistoxin und filamentösem Hämagglutinin, einem ausgesprochen immunogenem Bestandteil von *Bordetella pertussis*, erbrachte einen Impfstoff, der im Tierversuch erfolgreicher protektive Immunität erzielte als die formalinbehandelte Vakzine (Watanabe et al., 2000).

Im Falle der Kopplung von Retinolsäure an den monoklonalen Antikörper 15/7 reagierte EDC zunächst mit der Carboxylgruppe an der Retinolsäure oder am Antikörper unter Bildung eines reaktiven O-acyl-Harnstoffderivats.

An der Carboxylgruppe, die dadurch aktiviert wurde, entstand durch Ankopplung des Antikörpers über eine primäre Aminogruppe eine Peptidbindung. Der Mediator EDC wurde als wasserlösliches Harnstoffderivat freigesetzt. Die Hydrolyse des EDC-Intermediats ist dabei die bestimmende Reaktion während der Kopplung, abhängig von Temperatur, pH und Pufferkonzentration.

3.4 In vivo-Tumormodelle

SCID-Mäuse sind geeignete Wirtstiere für eine Vielzahl von humanen Tumoren. Sie machen Studien an disseminierten Tumoren möglich, die in anderen Tumormausmodellen wie zum Beispiel der thymuslosen Nacktmaus deutlich schwieriger zu realisieren sind (Mueller, Reisfeld, 1991). Untersuchungen an disseminierten Tumoren sollen eine Annäherung an die Metastasierung humaner Malignome sein. Durch die systemische Applikation von Tumorzellen mit dem Ziel eines Anwachsens an möglichst vielen Stellen im Organismus wird die Streuung von einem primären Tumorherd aus simuliert, wie sie natürlicherweise im Rahmen maligner Erkrankungen vorkommt.

Das Severe Combined Immunodeficiency Syndrome (SCID) ist die folgenschwerste Erkrankung des menschlichen lymphatischen Systems. Diese Mutation bei Mäusen wurde erstmals 1983 von Bosma et al. beschrieben. Diese Mäuse hatten eine defiziente Funktion sowohl der T- als auch der B-Lymphozyten. Sie bildeten kaum Immunglobuline. Kutane Allotransplantate wurden nicht abgestoßen, was das dramatischste Zeichen für die T-Zell-Defizienz darstellte.

SCID-Mäuse entstanden initial durch eine Punktmutation auf Chromosom 16 (Bosma et al., 1989). Durch eine DNA-Reparatur-Störung ist die Reifung der Lymphozyten unterbrochen und ein Defizit an zirkulierenden, maturen, funktionellen T- und B-Zellen entstanden. Dabei ist die Zahl und Funktion der Monozyten / Makrophagen, natürlichen Killerzellen und Granulozyten normal. Die Host-versus-graft-disease, also Wirt-gegen-Spender-Krankheit, kann von

Maus zu Maus beträchtlich variieren. Sie wurde ebenfalls als abhängig von dem für die Übertragung benutzten histologischen Tumortyp beschrieben.

Sowohl für murine Granulozyten, Makrophagen als auch natürliche Killerzellen wurde gezeigt, dass sie dazu beitragen, das Angehen des Tumorzell-Engraftments zu hemmen.

An SCID-Mäusen wurden bereits mehrere Therapiemodalitäten gegen Krebs getestet. Was die antikörperbasierte Therapie anbelangt, so ist bekannt, dass für den Antitumoreffekt die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität verantwortlich ist. Sie wird durch residente Wirtszellen vermittelt. SCID-Maus-Modelle wurden wirkungsvoll angewandt, um neue Chemotherapeutika und ihre Verabreichungsmöglichkeiten zu evaluieren. Die Ergebnisse solcher Studien deuten an, dass Daten aus SCID-Maus-Modellen gut mit Beobachtungen bei Krebspatienten korrelieren (Bankert et al., 2001).

Das gute Angehen der hier benutzten SK-N-MC-Zellen in der SCID-Maus bei subkutaner Injektion wurde in Vorversuchen beobachtet, wo die Rate des Anwachsens bei etwa 75 % lag (Voigt et al., 1997).

4 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, auf experimentellem Wege eine neue Möglichkeit der Neuroblastomtherapie zu untersuchen. Im Mittelpunkt stand die Frage, ob Immunkonjugate aus all-*trans*-Retinolsäure und dem monoklonalen Anti-Neuroblastom-Antikörper 15/7 einen Weg zur Verbesserung der Therapie des Neuroblastoms darstellen könnten.

Zunächst war die Frage zu beantworten, ob es gelingt, mit der Cabodiimid-Methode, bei der Retinolsäure und monoklonaler Antikörper über EDC gekoppelt werden sollten, funktionsfähige Immunkonjugate herzustellen. Die Kopplung war so zu optimieren, dass eine optimale Ausbeute an Antikörper erreicht wird. Im ersten Schritt nach der Kopplung wurde in einem Zell-ELISA getestet, ob die Bindungsfähigkeit des monoklonalen Antikörpers auch nach der Kopplung erhalten bleibt.

Mittels in vitro-Tests sollte gefunden werden, ob die Immunkonjugate im Vergleich zu Kontrollsubstanzen (NaCl, Ethanol, Retinolsäure, Antikörper und ungekoppeltes Gemisch aus Antikörper und Retinolsäure) das Zellwachstum der Kulturzelllinie SK-N-MC hemmen.

Im Tierversuch wurde zunächst bei SCID-Mäusen ein Modell eines disseminierten Neuroblastoms mit SK-N-MC-Zellen etabliert. An diesem Modell sollte untersucht werden, ob durch die Behandlung mit Immunkonjugaten im Vergleich zu Kontrollsubstanzen (NaCl, Retinolsäure, Antikörper und ungekoppeltes Gemisch aus Retinolsäure und Antikörper) das Tumorwachstum bei den Tieren vermindert und das Überleben verbessert werden könnte.

Immunzytologische (APAAP-Tests) und histochemische Tests sollten zeigen, ob der Reifegrad der Tumorzellen nach der Behandlung mit den Immunkonjugaten zunimmt.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien

- BSA, Serva, Heidelberg
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung PBS nach Gibco, 5fach konzentriert
Einfach konzentriert: auf 1 Liter Aqua dest. 0,21 g KH_2PO_4 + 0,726 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \times \text{H}_2\text{O}$ + 9,00 g NaCl; pH 7,3
- DMSO, Serva, Heidelberg (Einfrierlösung: 50 % Medium, 45 % FKS, 5 % DMSO)
- Ethylendiamintetraessigsäurelösung EDTA, Germed, Dresden
- Tris=Tris(hydroxymethyl)aminomethan, ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
- 6,1 g Tris + 8,8 g NaCl + 37,0 ml 1n HCl ad 1 l Aqua dest., pH 7,6+0,2
- 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC, Molekulargewicht 191,7; Pierce, Rockford, USA)
- All-*trans*-Retinolsäure (MW 300,4; ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA)
- 2-(N-Morpholino)-ethan-sulfonsäure (MES, Pierce, Rockford, USA)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva Blue G, Serva, Heidelberg)
- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT, Sigma, Steinheim)
- Sodium-Dodecylsulfat (SDS, 2 %, ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA)
- APAAP Kit System 40 Monoclonal (Dako, Hamburg)
- Glycergel (Dako, Hamburg)

5.2 Monoklonale Antikörper für Untersuchungen

- Anti-Neuroblastom-Antikörper 15/7 (Dr. A. Voigt, Jena), Antigen nicht definiert
- MOPC-141-Antikörper (Sigma, Steinheim)

- Alkalische Phosphatase-konjugierter Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (Alkaline Phosphatase-Conjugated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulin, Dako, Hamburg)
- Schaf-Anti-Maus-Antikörper (Boehringer, Mannheim)
- Anti-Human Intercellular Adhesion Molecule-1-Antikörper (ICAM, CD 54, Clone 6.5B5, Dako, Hamburg)
- Anti-Human Neural Cell Adhesion Molecule-Antikörper (NCAM, CD 56, Clone UJ13A, Dako, Hamburg)
- Anti-Human Vascular Cell Adhesion Molecule-1-Antikörper (VCAM, CD 106, Clone 1.4C3, Dako, Hamburg)
- Anti-Human Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-Antikörper (PECAM, CD 31, Clone JC/70A, Dako, Hamburg)
- Anti-Insulin-like Growth Factor-1 Receptor-Antikörper (IGF-1-R, Dianova, Hamburg)
- Anti-Transforming Growth Factor Receptor-Antikörper (TGF-R, CD 105, Dako, Hamburg)
- Anti-Human Nerve Growth Factor Receptor-Antikörper (NGF-R, p 75, Dako, Hamburg)
- Anti-beta-Tubulin (Clone KMX-1, Boehringer, Mannheim)
- Anti-Human Glial Fibrillary Acidic Protein-Antikörper für APAAP (GFAP, Dianova, Hamburg)
- Anti-Human Neuroloblastoma 84-Antikörper (NB 84, Dako, Hamburg)
- Anti-Human Neurolofilament 68 kD-Antikörper (NF 68, Clone NR4, Medac Diagnostika, Hamburg)
- 14G2a Anti-Disialogangliosid-Antikörper (GD2, von RA Reisfeld, La Jolla, USA)
- Peroxidase-konjugierter Schaf-Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper (Dako, Hamburg)
- Anti-Ki67 Antigen-Antikörper (Ki67, Clone MM1, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK)
- Anti-Human Neurolofilament Protein-Antikörper (NF, Clone 2F11, Dako, Hamburg)

- Anti-Human Chromogranin A-Antikörper (Chromogranin, clone DAK-A3, Dako, Hamburg)
- Anti-Synaptophysin-Antikörper (Synaptophysin, Clone Snp88, BioGenex, San Ramon, USA)
- Anti-Human Glial Fibrillary Acidic Protein-Antikörper für Immunhistochemie (GFAP, Clone 6F2, Dako, Hamburg)
- Anti-S100-Antikörper (S100, Dako, Hamburg,)
- Anti-Alpha-Internexin-Antikörper (Clone 2E3, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK)

5.3 Zellkultur

- SK-N-MC, permanente Neuroblastomzelllinie
- Neuroblastom-Medium
Ansatz für zwei Liter:
HAM'S F12-Medium 10,71 g + IMDM-Medium 17,80 g
10 % fötales Kälberserum (FKS, Greiner, Frickenhausen)
50 mM Gentamicin (Ratiopharm, Ulm)
20 mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, „stabiles Glutamin“ (Biochrom, Berlin)
- CO₂-Brutschrank (5 % CO₂, 37 °C, Heraeus, Hanau)
- Sterile Werkbank Herasafe (Heraeus, Hanau)

5.4 Laborgeräte

- Plattenphotometer (Spektrometer und Computer: SLT Spektra, Crailsheim)
- Zytocentrifuge Cytospin 3 (Shandon, Pittsburgh, USA)
- Zentrifuge Universal 30 RF (Hettich, Tuttlingen)

5.5 Materialien

- Zellkulturplatten (mit sechs und 24 Vertiefungen) und -flaschen (Greiner, Frickenhausen)
- Mikrotiterplatten (Flachbodenplatte, 96 Vertiefungen, Greiner, Frickenhausen)
- Pipetten (Eppendorf, Hamburg)
- Filtrationskonzentrator „Centricon“ (Cutoff-Grenze 30 kDa, Millipore Corporation, YM 30, Bedford, USA)
- Filtrationskonzentrator „Centriprep“ (Cutoff-Grenze 30 kDa, Millipore Corporation, YM 30, Bedford, USA)
- Entsalzungssäule (D-Salt Excellulose Plastic Desalting Column, Pierce, 5 ml, Rockford, USA)
- Spritzenfilter DynaGard; 0,2 µm (Mikrogon, Laguna Hills, USA)
- 1-ml-Feindosierungsspritze mit integrierter Kanüle der Größe 29 G (Omnican, B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

5.6 Monoklonale Antikörper für die Immunkonjugation

Der in dieser Arbeit für die Kopplung mit Retinolsäure verwendete monoklonale Antikörper war der murine Antikörper 15/7. Er gehört der Immunglobulin-subklasse IgG 2b an und hat ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa. Er wurde ursprünglich durch die Hybridomtechnik gewonnen, indem Mäuse mit Neuroblastomzellen immunisiert und anschließend ihre Milzzellen mit Mausmyelomzellen fusioniert wurden (Voigt et al., 1993).

Nach der Gewinnung lag der Antikörper in PBS vor. Dieser Antikörper zeigt außer zu Perineurium und interstitiellem Bindegewebe keine Kreuzreaktivität gegenüber normalem und malignem Gewebe (Voigt et al., 1993).

5.7 Retinolsäure

Es wurde mit all-*trans*-Retinolsäure gearbeitet (Abb. 1). Die Retinolsäure lag in Pulverform vor. Die Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt bei 4-8 °C. Aufgrund der hohen Lichtempfindlichkeit wurde darauf geachtet, dass die Retinolsäure bei allen Reaktionsschritten nur über minimale Zeiträume dem Licht ausgesetzt war.

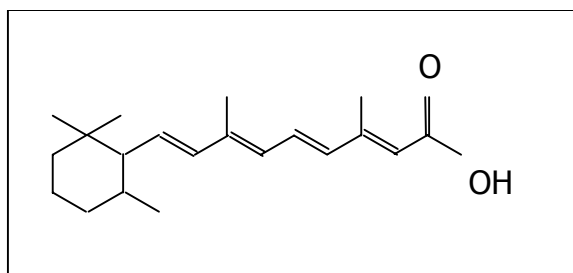


Abb.1: Formel für all-*trans*-Retinolsäure

Die in Wasser unlösliche Retinolsäure kann in Ethanol gelöst werden und bleibt auch bei weiterem Verdünnen gelöst. Nach Herstellerangaben sind 3 mg Retinolsäure in 10 ml 70%igem Ethanol löslich (Sigma Product Information Sheet). In den vorliegenden Experimenten diente ein Verhältnis von 3 mg Retinolsäure in 10 ml 96%igem Ethanol als Ausgangslösung (10^{-3} M). War die Retinolsäure in dieser Ausgangsverdünnung noch unvollständig gelöst, wurde bis zum vollständigen Lösen 1 n NaOH in 20 µl-Schritten zupipettiert. Der pH wurde danach wieder durch Pipettieren von 1 n HCl auf den Wert von 4,7 eingestellt.

Für weitere Verdünnungen dieser Stammlösung diente mittels eines 0,2 µm-Sterilfilters sterilisiertes Wasser. Für die Immunkonjugation wurde die Stammlösung mit sterilem Konjugationspuffer 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES) weiter verdünnt.

5.8 Konjugation von Retinolsäure und einem monoklonalen Antikörper

5.8.1 Mediator

Als Mediator der Kopplung von all-*trans*-Retinolsäure an den monoklonalen Antikörper, die vollständig unter keimarmen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank stattfand, diente EDC (Abb. 2). Je nach Versuchsbedingungen wurden 5 – 1000 µg EDC direkt vor Verwendung in Aqua destillata gelöst, diese Lösung sterilfiltriert und unmittelbar zu der Antikörper-Retinolsäure-Lösung gegeben.

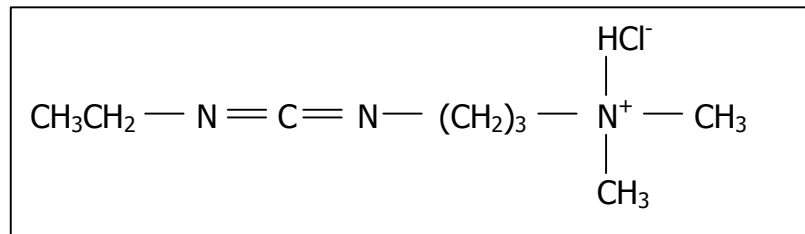


Abb.2: Formel für EDC

5.8.2 Vorbereitung des Antikörpers

Von der in PBS vorliegenden Stammlösung des monoklonalen Antikörpers 15/7 wurden zunächst 50 µl für spätere Messungen wie Konzentrationsbestimmungen und MTT-Test abgenommen. Danach erfolgte die Umpufferung in den Konjugationspuffer MES. Dieser Konjugationspuffer bestand aus 0,1 M MES; 0,9 M NaCl und 0,02 % NaN₃. Der pH-Wert der Lösung, bei dem später auch die Kopplungsreaktion ablief, wurde auf 4,7 eingestellt.

Als Filter für die Umpufferung diente der Ultrafiltrationskonzentrator „Centricon“ für ein Volumen von maximal 1 ml. Vor dem Versuch mußte die MES-Lösung noch sterilfiltriert und der Centricon über eine Dauer von mindestens 30 min in 70%igem Ethanol desinfiziert werden.

Bis zum Versuchsbeginn wurde der Centricon-Filter steril abgedeckt, gekühlt und gegen Austrocknung mit einer sterilen Lösung aus PBS mit 0,1 % BSA gefüllt aufbewahrt. BSA blockierte in diesem Fall die Plastikoberfläche der Filtrationsröhrchen, um Antikörperverluste durch unspezifische Adhäsion an die Oberfläche möglichst gering zu halten. Vor Versuchsbeginn wurden die Centricon-Filter dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, um in der Lösung enthaltenes BSA zu entfernen. Von der Antikörperlösung wurde 1 ml in einen Centricon eingefüllt und bei 3000 U/min für 20 min zentrifugiert. Das Konzentrat wurde in Abhängigkeit von der Menge des Antikörpers mit MES suspendiert und stand in dieser Lösung für die Kopplung zur Verfügung.

5.8.3 Vorbereitung der Retinolsäure

All-*trans*-Retinolsäure wurde wie in 5.7 beschrieben in Ethanol gelöst und anschließend mit MES weiter verdünnt. Die erforderlichen Volumina der Antikörper- und der Retinolsäurelösung wurden kurz vor der Kopplungsreaktion miteinander vermischt (Abb. 3).

5.8.4 Kopplung

Die stets frisch hergestellte EDC-Lösung wurde zu dem Gemisch aus Antikörper und Retinolsäure hinzugefügt. Dieser Reaktionsansatz inkubierte anschließend zwei Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler. Dabei bildeten sich das Antikörper-Retinolsäure-Konjugat und ein Harnstoffderivat als Reaktionsprodukt des EDC. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte die Trennung der ungebundenen Retinolsäure und des Harnstoffderivats von der Konjugatlösung mittels Gelfiltration (Herstellerempfehlung des Konjugationskits) oder Zentrifugation.

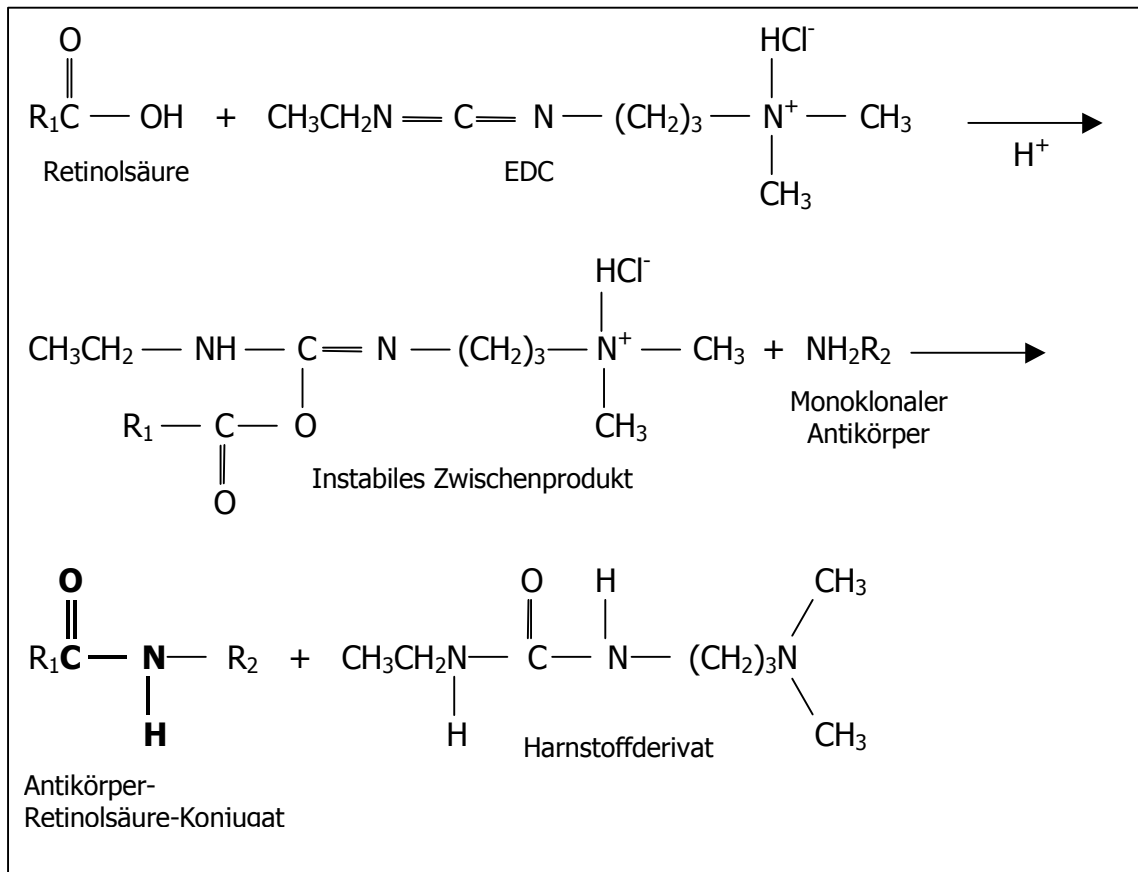


Abb.3: Reaktionsgleichung für die EDC-Kopplung

Abtrennung der ungebundenen Retinolsäure durch Gelfiltration

Für die Gelfiltration wurde die Entsalzungssäule zunächst mit drei bis fünf Säulenvolumina PBS äquilibriert. Die Konjugatlösung mit einem Gesamtvolumen von etwa 1 ml wurde zuerst auf die Säule gegeben, danach in 0,5 ml-Schritten PBS. Die Fraktionen, die je Auftrag auf die Säule gewonnen werden konnten, wurden in einzelnen Röhrchen gesammelt. Nachdem das Totvolumen von etwa zwei Milliliter aus der Säule entnommen war, konnten die konjugathaltigen Fraktionen aufgefangen werden. Die Fraktionen, in denen Konjugat enthalten war, wurden mit der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt.

Auffällig war zum einen die deutliche gelbe Verfärbung der Säule nach der Trennung. Darüberhinaus ergab der Proteinnachweis im Konjugat nach der Trennung im Vergleich zum eingesetzten Antikörper nur eine Antikörperausbeute von 15 % – 37 %. Beides sprach für hohe Verluste an Konjugat durch Rückhalt oder nicht ausreichend mögliche Abtrennung aus der Säule.

Abtrennung der ungebundenen Retinolsäure durch Zentrifugation

Als alternative Methode für die Trennung von ungebundener Retinolsäure und dem Harnstoffderivat als Reaktionsprodukt des EDC auf der einen und dem Antikörper-Retinolsäure-Gemisch auf der anderen Seite wurde daraufhin die Zentrifugation mittels des Filtrationskonzentrators „Centriprep“ mit einem Volumen von maximal 15 ml gewählt.

Der Centriprep wurde in gleicher Weise wie bereits der Centricon vorbehandelt. Nach einer Desinfektion mit 70%igem Ethanol über mindestens 30 Minuten blieb der Filter bis zum Versuchsbeginn steril abgedeckt, gekühlt und, um ein Austrocknen zu vermeiden, aufgefüllt mit einer sterilen Lösung aus PBS mit 0,1 % BSA. Vor der Verwendung wurde der Filter dreimal mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen.

Die Konjugatlösung wurde dann in den „Centriprep“ eingefüllt und bis zur 15 ml-Markierung in 1 ml-Schritten mit sterilem 0,9%igem NaCl aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte bei 3000 U/min. Sie wurde in drei Schritten mit einer Dauer von fünfzehn, zehn und fünf Minuten durchgeführt. Nach jedem Schritt wurde die filtrierte Lösung gesammelt. Da die Cutoffgrenze des Filtrationskonzentrators deutlich über der Molekülgröße der Retinolsäure lag, wurde im Gegensatz zum Konjugat die freie, ungekoppelte Retinolsäure nicht vom Filter zurückgehalten. Dieser Anteil konnte anschließend im Filtrat bestimmt werden.

5.8.5 Vorbereitung des Konjugates für die Versuche

Das Konzentrat wurde steril in ein Röhrchen aufgenommen und mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung auf das Volumen gebracht, das für Tierversuche und in vitro-Bestimmungen notwendig war.

Von dieser Lösung wurden die notwendigen Volumina für die Messung der Antikörperkonzentration, für den Zell-ELISA zum Test der Bindungsfähigkeit des Konjugates und für den Proliferations-(MTT-)Test entnommen.

Der verbleibenden Restlösung wurde Natriumazid in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugesetzt, die Einwirkzeit betrug mindestens acht Stunden.

Die Konjugatlösung wurde anschließend in sterile Röhrchen so portioniert, dass sie unmittelbar für die einzelnen Tierversuchstage verwendet werden konnte.

5.9 In vitro-Testung der Konjugate

5.9.1 Konzentrationsbestimmung

Proteinbestimmung nach Bradford zur Konzentrationsbestimmung des Antikörpers

Zur Messung der Konzentration des Antikörpers im Antikörper-Retinolsäure-Konjugat dienten verschiedene Methoden. Unspezifische und spezifische Nachweismethoden wurden parallel durchgeführt.

Als unspezifische Methoden zum Proteinnachweis standen die Verfahren nach Bradford und nach Lowry zur Verfügung. Voraussetzung für beide Methoden war jeweils das Vorhandensein einer Proteinlösung, die nur eine Art von Eiweiß enthielt, in unserem Fall den Antikörper.

Für jeden Versuch wurden drei Parallelen vermessen und aus den Ergebnissen der Mittelwert bestimmt.

Die Bradfordmethode beruht auf der Verwendung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250. Wenn der Farbstoff an Protein bindet, wechselt die Farbe von rot zu blau. Der Protein-Farbstoff-Komplex hat einen hohen Extinktionskoeffizienten, dadurch ist die Messung sehr sensitiv. Dieser Farbstoffassay ist etwa viermal so sensitiv wie der Lowryassay (Bradford, 1976).

Für den Vorratspuffer wurden 350 mg Serva Blue G in 100 ml 95 % Ethanol gelöst. Zu dieser Lösung wurden 200 ml 88 % H_3PO_4 hinzugefügt und diese Lösung abgedunkelt bei Raumtemperatur aufbewahrt. Für Nachweisreaktionen wurde ein Arbeitspuffer hergestellt aus 1,2 ml der Ausgangslösung mit 0,6 ml 95 % Ethanol; 1,2 ml 88 % H_3PO_4 und dieser mit 17 ml Aqua bidestillata auf ein Endvolumen der Farbstofflösung von 20 ml aufgefüllt.

Jeweils 20 µl der zu messenden Proteinlösung wurden in 96er-Mikrotiter-Platten mit Flachboden mit 200 µl der Farbstofflösung versetzt und die Extinktion bei 620 nm am Plattenphotometer bestimmt. Aus der Extinktion wurde mit Bezug auf eine Standardkurve mit BSA von 5 – 200 µg/ml die Proteinkonzentration berechnet.

Proteinbestimmung nach Lowry zur Konzentrationsbestimmung des Antikörpers

Der Proteinnachweis nach Lowry wird mit einem alkalischen Kupferreagenz durchgeführt, in der sich auch präzipitierte Proteine rasch auflösen und somit gut nachweisbar sind. Die Farbreaktion beruht auf der Bindung des Farbstoffs an Tryptophan und Tyrosin im Protein und läuft in zwei Schritten ab. Zunächst reagiert das Protein in dieser alkalischen Lösung mit dem Kupfer, anschließend wird das Folinreagenz durch das kupferbehandelte Protein reduziert (Lowry et al., 1951).

Diese Meßmethode mit Kupfer und Folinreagenz ist sensitiv und einfach. Ihre Nachteile sind jedoch die je nach Protein variierende Intensität der Färbung und die nicht strenge Proportionalität des Färbeausmaßes zur Konzentration (Lowry et al., 1951).

Die Bestimmung der Antikörperkonzentration erfolgte mit Bezug auf eine Standardkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen von 50 bis 1000 µg/ml. Die unbekannte Probe wurde zu 50 µl in eine Mikrotiterplatte mit Flachboden pipettiert. Anschließend erfolgte für fünf Minuten die lichtgeschützte Inkubation mit 50 µl der Umsatzlösung, die sich aus 1 ml 1 % CuSO₄, 1 ml 2 % K-Na-Tartrat und 50 ml Na₂CO₃ in 1 n NaOH zusammensetzte. Für 30 Minuten erfolgte dann die Inkubation mit 50 µl 2 n Folinreagenz. Im Anschluß wurde bei Raumtemperatur die Extinktion der Lösung bei 690 nm gemessen.

Proteinbestimmung mittels Enzyme linked immunosorbent assay

Die Methoden des Proteinnachweises nach Bradford und nach Lowry sind beide einfach und rasch durchführbare Tests. Mit beiden Verfahren war jedoch eine zu hoch gemessene Proteinkonzentrationen im Konjugat zu erwarten, da die Filter Centricon und Centriprep vor ihrer Benutzung mit BSA blockiert wurden und auch nach dem Spülen mit geringen Restmengen an BSA zu rechnen war. Parallel erfolgte aus diesem Grund zum Vergleich die Proteinmessung mit der aufwendigeren aber spezifischeren immunchemischen Nachweismethode Peroxidase-ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay).

Die Grundlage dieser Technik ist die Erkennung von murinen Antikörpern mittels Antigen-Antikörper-Reaktion. Der Nachweis fand in 96-well-Mikrotiterplatten mit Flachboden statt, die mit einem Wandantikörper (Schaf-IgG gegen Mausimmunglobulin) beschichtet waren und bei $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt wurden. An diesen Wandantikörper binden die monoklonalen Mausantikörper über ihren Fc-Teil sowohl in nativer Form als auch in Form der Antikörper-Retinolsäure-Konjugate.

Als Bezug für die Antikörperkonzentration diente eine Standardkurve mit Konzentrationen von $0,01\text{ }\mu\text{g/ml}$ bis $0,2\text{ }\mu\text{g/ml}$ von MOPC-141-Antikörper, der wie der 15/7-Antikörper der Immunglobulinsubklasse IgG2b angehört. Jeweils $50\text{ }\mu\text{l}$ der bekannten Standard-Konzentration und von Verdünnungen (hergestellt mit $0,1\text{ }\%$ BSA/PBS) der unbekannten Antikörper- und Konjugatkonzentrationen wurden in die Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur auf dem Plattenschüttler wurde der Überstand abgekippt und je well dreimal mit $200\text{ }\mu\text{l}$ $0,1\text{ }\%$ BSA/PBS gewaschen. Anschließend wurde Peroxidase-konjugiertes Schaf-Anti-Maus-Immunglobulin hinzugegeben, das an den murinen monoklonalen Antikörper binden würde. Die Inkubation mit je $100\text{ }\mu\text{l}$ einer Verdünnung aus $3\text{ }\mu\text{l}$ Peroxidasekonjugat und 5 ml Verdünnungspuffer ($0,1\text{ }\%$ BSA/PBS) dauerte 30 min. Danach wurde die Platte erneut dreimal mit $200\text{ }\mu\text{l}$ $0,1\text{ }\%$ BSA/PBS je well gewaschen. Als Substrat für die Peroxidase diente anschließend Orthophenyldiamin.

Eine Tablette mit 10 mg Orthophenyldiamin wurde in 50 ml Citratpuffer (5 g Zitronensäuremonohydrat + 7 g Na_2HPO_4 , aufgefüllt mit 500 ml Aqua destillata, pH 5,0) gelöst und zu dieser Lösung 6 μl Wasserstoffperoxid hinzugefügt. Je well erfolgte eine Inkubation mit 100 μl Substratlösung, die Inkubationsdauer betrug in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Farbumschlags 10 bis 50 Minuten. Danach wurde die Reaktion mit einer Stopplösung (50 μl 6 n H_2SO_4 je Napf) abgebrochen und die Extinktion der rotbraunen Lösung bei 492 nm vermessen. Auf der Basis des Computerprogramms wurde die Proteinkonzentration im Vergleich zur Standardkurve berechnet.

Wichtig für die Auswertbarkeit der Messung war die korrekte Verdünnung der vorliegenden unbekannten Antikörperlösung, deren Konzentration für die Messung zwischen 0,01 und 0,2 $\mu\text{g/ml}$ liegen sollte.

Retinolsäure-Konzentrationsbestimmung

Für die Ermittlung der Retinolsäure-Konzentration im Konjugat wurde eine eigene Methode etabliert, die sich ebenso auf die Messung der Extinktion stützte. Das Absorptionsmaximum für all-*trans*-Retinolsäure liegt bei 340 nm, also im ultravioletten Bereich. Aufgrund der uns zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten bestimmten wir die Absorption der Retinolsäure bei 405 nm bei einem pH von 7,0. Durch diese Messung würde hauptsächlich die Retinolsäure erfaßt werden, da das Absorptionsmaximum von Proteinen, die Tyrosin, Phenylalanin oder Tryptophan enthalten, bei 280 nm liegt (Wetlaufer, 1962).

Zunächst wurde eine Standardkurve mit jeweils 200 μl von bekannten Retinolsäurekonzentrationen, verdünnt mit NaCl, pH etwa 7,0, aufgestellt. Diese Kurve wurde für alle weiteren Kopplungsversuche verwendet. So konnte aus einer gemessenen Extinktion die Konzentration der Retinolsäure zurückgerechnet werden. Diese Eichkurve verlief nicht in allen Abschnitten linear.

Verdünnungen der zu vermessenden Lösungen wurden so gewählt, dass die abgeschätzte Retinolsäurekonzentration in der Verdünnung im linearen Anteil zu erwarten war. Nach einer Immunkonjugation wurden 200 µl des Konjugates entnommen und die enthaltene Retinolsäure bestimmt.

5.9.2 Bindungsfähigkeit der Konjugate

Vorbereitung des Tests

Um zu prüfen, ob es durch die Kopplung nicht zu einer Beeinträchtigung der Bindungsfähigkeit des Antikörpers käme, wurde ein Zell-ELISA durchgeführt. In diesem Test sollte das Ausmaß der Bindung gleicher Konzentrationen des nativen Antikörpers und des Antikörpers im Antikörper-Retinolsäure-Konjugat an Neuroblastomzellen untersucht werden.

Zunächst wurden SK-N-MC-Tumorzellen geerntet und mit 0,1 % BSA/PBS/EDTA auf $1-2 \times 10^6$ /ml eingestellt. Zeitgleich wurde eine 96-well-Mikrotiterplatte (Flachboden) 30 Minuten mit 1 % BSA/PBS blockiert, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Plastikoberfläche gering zu halten, und anschließend ausgeklopft. Die vorbereiteten Zellen wurden zu je 100 µl in die Platte ausgesät. Es erfolgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 1000 U/min und ein Ausklopfen der Platte.

Durchführung des Tests

Die das Antigen tragenden Zellen wurden mit Verdünnungen (hergestellt mit 0,1 % BSA/PBS) des nativen anti-Neuroblastom-Antikörpers und des Konjugates sowie mit einer Negativkontrolle (0,1 % BSA/PBS) eine Stunde lang abgedunkelt bei Zimmertemperatur auf dem Plattenschüttler inkubiert. Ziel war es, jeweils gleiche Konzentrationen von nativem und gekoppeltem Antikörper vergleichen zu können. Die Platte wurde nach diesem ersten Schritt dreimal jeweils mit 200 µl 0,1 % BSA/PBS je Napf gewaschen und fünf Minuten mit 1000 U/min zentrifugiert.

Anschließend erfolgte für eine Stunde die Inkubation mit einem alkalische Phosphatase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper. Dazu wurde eine Verdünnung von 5 µl Phosphatasekonjugat mit 5 ml Verdünnungspuffer (0,5 % BSA/PBS) und 2,5 mg Tween hergestellt. Von dieser Konjugatlösung wurden je Napf 100 µl pipettiert. Danach wurde die Platte erneut dreimal jeweils mit 200 µl 0,1 % BSA/PBS je well gewaschen und fünf Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert.

Unmittelbar vor der Verwendung wurde die Substratlösung hergestellt. Dazu wurden 9,33 mg 4-Nitrophenyl-Phosphat in 10 ml Puffer (1 mol/l Diethanolamin, 0,5 mmol/l MgCl_2) gelöst. Je well erfolgte eine Inkubation mit 100 µl Substratlösung abgedunkelt bis zu einem Farbumschlag von farblos zu gelb. Die Extinktion der Lösung wurde bei 405 nm nach fünf und nach zehn Minuten am Plattenphotometer gemessen.

5.9.3 Beeinflussung des Zellwachstums

MTT-Test direkt nach der Kopplung

Der Einfluß des Konjugates auf Lebensfähigkeit und Wachstum von Neuroblastomzellen in der Kultur im Vergleich zum nativen Antikörper, Retinolsäure und dem ungekoppelten Gemisch aus Antikörper und Retinolsäure wurde mit dem MTT-Test untersucht. In Abhängigkeit von der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen lebender Zellen wird der Tetrazoliumring des MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)diphenyl-tetrazoliumbromid) aufgebrochen, und es entsteht dunkelblaues wasserunlösliches Formazan. Das Formazan wird dann durch das Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (SDS) aufgelöst und bei 570 nm photometrisch bestimmt.

Für den Versuch wurden SK-N-MC-Zellen in einer Konzentration von 2×10^4 /ml zu je 100 µl in eine Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Je Versuchsgefäß wurden 10 µl der Testsubstanzen in vergleichbaren Konzentrationen (Konjugat, Antikörper, Retinolsäure, ungekoppeltes Gemisch, Negativkontrollen Ethanol als Lösungsmittel für Retinolsäure und Medium als

Lösungsmittel für Antikörper und Konjugat) insgesamt dreimal im Abstand von zwei Tagen zur Kultur gegeben. Im Anschluß wurden 10 µl MTT pro well pipettiert und vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 100 µl SDS-Lösung pro Napf pipettiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach zehn Minuten Schütteln erfolgte dann die photometrische Messung bei 570 nm (gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm) am Plattenphotometer.

MTT-Test nach drei, neun und 28 Tagen nach der Kopplung

Jeder Tierversuch war über eine Dauer von etwa drei bis vier Wochen geplant. Für jeden Versuch sollte in einer einzigen Kopplung ausreichend Konjugat für alle Applikationen hergestellt werden. Die Peptidbindung im Immunkonjugat sollte also im günstigsten Fall über die Dauer von drei bis vier Wochen stabil bleiben. Daher erfolgte nach drei, neun und 28 Tagen mit dem Konjugat ein erneuter MTT-Test, um die Stabilität des Konjugates überprüfen zu können. Die Extinktion der Kultur nach Konjugatinkubation wurde mit der nach Inkubation mit dem ungekoppelten Gemisch aus Antikörper und Retinolsäure verglichen. Die Kulturen wurden während der Inkubationszeit mit den Testsubstanzen auch morphologisch auf die Ausbildung von Neuritenfortsätzen als Zeichen einer möglichen Reifung untersucht.

5.10 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden an weiblichen Mäusen mit schwerem kombinierten Immundefekt (severe combined immunodeficiency, SCID) durchgeführt. Die Tiere stammten aus dem Institut für Versuchstierkunde der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Standort Tierhaus III, Beutenberg, wo sie während der Versuche unter Barrierehaltung gehalten wurden.

Für die Versuche dienten sechs bis acht Wochen alte weibliche Mäuse. Die Tiere lebten in Gruppen von vier bis fünf in einem Uniprotect Luftstromschrank (Käfige und Luftstromschrank von der Firma EHRET).

Sie wurden ad libitum mit 1434 Nacktratte/Nacktmaus Z/H Pelletfutter der Firma Altromin gefüttert. Als Tränkwasser wurde autoklaviertes auf einen pH von 2,7 – 3,2 angesäuertes Leitungswasser ad libitum verabreicht. Die Versuchstiere wurden einmal pro Woche unter der Flowbox umgesetzt und zweimal wöchentlich gewogen. Das Raumklima war durch eine Haltungstemperatur von 23 °C und eine Luftfeuchte von 40 – 60 % charakterisiert. Eine Genehmigung des Versuchsvorhabens nach §8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes durch das Thüringer Ministerium für Gesundheit und Soziales lag vor.

5.11 Etablierung eines SCID-Maus-Tumor-Modells

5.11.1 Tumorzellen

SK-N-MC-Zellen zur Etablierung des Tiermodells waren entweder bei –196 °C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert oder stammten direkt aus der Kultur in Neuroblastommedium. Neuroblastomzellen aus flüssigem Stickstoff wurden im Wasserbad auf eine Temperatur von 37 °C gebracht, das Medium nach einer kurzen Zentrifugation abgezogen und die Zellen in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Aus der Kultur wurden die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase nach einer zehnminütigen Inkubation mit 20 mM EDTA und einem Waschvorgang mit PBS als Einzelzellsuspension in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.

Nach der Färbung mit Trypanblau wurden die Tumorzellen in einer Neubauerkammer gezählt und mit physiologischer Kochsalzlösung auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

5.11.2 Modelletablierung

SCID-Mäuse im Alter von vier bis sechs Wochen erhielten über eine 1-ml-Feindosierungsspritze mit integrierter Kanüle der Größe 29 G eine Injektion von 300 µl der Zellsuspension mit der eingestellten Zellkonzentration.

Je Versuchstier wurde dieses Volumen entweder vollständig intraperitoneal oder intravenös oder unmittelbar nacheinander 50 % intravenös in eine Schwanzvene und 50 % intraperitoneal injiziert. Für die intraperitoneale Injektion wurde nach Sprühdesinfektion perkutan ein unterer Quadrant des Abdomens punktiert. Vor der intravenösen Injektion erfolgte zunächst eine Immersion des Schwanzes in angewärmtes Wasser für etwa zwei Minuten, um eine Vasodilatation zu erreichen. Die Mäuse wurden vorsichtig manuell fixiert und nach Sprühdesinfektion eine Schwanzvene punktiert.

Gruppen von zwei bis vier Mäusen erhielten eine Injektion mit einer definierten Zellzahl, zunächst nur intraperitoneal oder intravenös. Hinsichtlich des Auftretens klinischer Zeichen für eine Krankheitsmanifestation wie gekräuseltes Fell, Lähmung, palpabler Tumor oder Gewichtsverlust erfolgte die tägliche Beobachtung der Tiere und zweimal wöchentlich eine Gewichtskontrolle.

Versuchsende

Bei beginnenden Erkrankungszeichen folgte umgehend die Tötung der Tiere durch Ether und die makroskopische Untersuchung der Organe auf Tumorbefall. Während der Präparation der SCID-Mäuse wurden von den Organen Proben entnommen. Aus diesen Proben wurden in Zellkulturplatten Zellsuspensionen angelegt und diese im Brutschrank kultiviert. Durch regelmäßige lichtmikroskopische Beurteilung der Zellkultur konnte der Verdacht auf ein eventuelles Aufwachsen der SK-N-MC-Zellen gestellt werden, und zwar dann, wenn die für SK-N-MC-Zellen typische spindelförmige Zellform mit neuritenartigen Ausläufern erkennbar war.

Ein Organ galt als von Neuroblastomzellen befallen, wenn entweder makroskopisch der Tumor sichtbar war oder in der Zellkultur aus der Organprobe SK-N-MC-Zellen aufwuchsen, auch ohne dass eine makroskopische Absiedlung vorlag. Zeigte eine Maus nach bis zu zwölf Wochen keine Krankheitszeichen, wurde sie getötet und auf Tumorbefall untersucht.

5.12 In vivo-Experimente

5.12.1 Letale Dosis der all-*trans*-Retinolsäure

Vor Beginn der Tierversuche mußte ausgeschlossen werden, dass durch die Retinolsäure selbst letale Effekte auftreten, die das Versuchsergebnis verfälschen. Dazu wurde die Dosis der Retinolsäure bestimmt, bei der zehn Prozent der Tiere nach einer Einzelinjektion verstarben (LD10).

Klinische Studien bei an Krebs erkrankten Kindern (Smith et al., 1992) zeigten eine maximale tolerierte Dosis der all-*trans*-Retinolsäure von 60 mg/m² Körperoberfläche/d. Für die Bestimmung der auf die Körperoberfläche bezogenen LD10 wurde als Testdosis eine im Vergleich zur Neuroblastomtherapie bei Kindern zehnfache Dosis getestet.

Rechnerische Grundlage war die Formel zur Berechnung der Körperoberfläche

$$\text{KOF} = \sqrt{\frac{\text{Körperlänge in cm} \times \text{Körpermasse in kg}}{3600}}$$

Für eine Maus mit der durchschnittlichen Länge von 10 cm und einer Masse von 25 g errechnet sich eine Körperoberfläche von 83,3 cm². Nach Verzehnfachung der Dosis aus dem Therapieprotokoll des Neuroblastoms ergibt sich eine Tagesdosis für die Bestimmung der LD10 von 5 mg je Versuchstier.

Die Versuchstiere erhielten eine intraperitoneale Injektion der Retinolsäure, gelöst in 10 % Ethanol. Kontrolltiere erhielten eine 10%ige Ethanollösung als intraperitoneale Injektion.

5.12.2 Beeinflussung des Tumorwachstums durch Immunkonjugate

Die Anzahl und die Masse der Tumoren je Versuchstier sollte unter dem Einfluß des Antikörper-Retinolsäure-Konjugates untersucht werden und mit Tumorzahl und Tumormasse unter dem Einfluß des Antikörpers und der Retinolsäure jeweils allein, des ungekoppelten Antikörper-Retinolsäure-Gemischs und physiologischer Kochsalzlösung als Negativkontrolle verglichen werden.

Für jeden Tierversuch wurde eine separate Kopplung von Antikörper und Retinolsäure durchgeführt. Am Tag 0 wurde den Versuchstieren 300 µl einer SK-N-MC-Zellsuspension mit 2×10^7 Zellen in sterilem 0,9 % NaCl zu je 50 % intravenös und 50 % intraperitoneal injiziert. Am zweiten bis dritten Tag wurden je Maus 300 µl der entsprechenden Testsubstanz intraperitoneal injiziert. Insgesamt wurden die Testsubstanzen je Maus im Abstand von zwei bis drei Tagen ein- bis sechsmal appliziert. Die Mäuse wurden während der Versuchsphase täglich auf Krankheitszeichen untersucht und zweimal wöchentlich gewogen. Nach einer definierten Zeit (20 bis 22 Tage) wurden die Mäuse durch Ether getötet.

5.12.3 Postmortale Untersuchung der Versuchstiere

Alle Tiere aus der Versuchsreihe Tumorwachstum wurden seziert und auf makroskopischen Tumorbefall untersucht. Die Zahl der Tumoren und deren genaue Größe wurden notiert. Anhand der Maße wurde die Tumormasse (W) in Gramm nach der Formel $W = (a^2 \times b) / 2$ berechnet, wobei a die Breite und b die Länge des Tumors in Zentimeter waren (Ovejera et al., 1978). Nach Ovejera gilt diese Formel vereinfacht für ein Ellipsoid und kann als gültige Annäherung angesehen werden, wenn eine einheitliche Dichte des Tumors angenommen wird.

Von Tumor, Leber, Milz, Niere, Gehirn, Herz, Lunge und Knochenmark wurden Proben entnommen. Diese Proben wurden in Kulturplatten mit je sechs Vertiefungen in Neuroblastommedium mit 10 % fetalem Kälberserum und 50 mM Gentamicin aufgenommen.

Diese Platten wurden im Brutschrank aufbewahrt und mikroskopisch regelmäßig auf das Anwachsen von für das Neuroblastom typisch erscheinenden Zellen mit neuritenartigen Ausläufern untersucht. Gleichzeitig wurden für spätere immunchemische Untersuchungen stark zerkleinerte Proben von den Tumoren und Organen in einer Lösung aus 50 % Neuroblastommedium, 45 % fetalem Kälberserum und 5 % DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus diesen eingefrorenen Organproben wurden später Zytozentrifugenpräparate hergestellt und immunzytologisch angefärbt.

Außerdem wurden von ausgewählten Organen Paraffinschnitte angefertigt und mit immunhistochemischen Methoden angefärbt (Institut für Pathologie). Dazu wurden die Schnitte mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene Ki67, S100, Chromogranin, Synaptophysin, GFAP, Alpha-Internexin und Neurofilament gefärbt. Die Auswertung der Färbung erfolgte nach dem gleichen Schema wie im Falle der APAAP-Färbung (siehe 5.12.5).

5.12.4 Beeinflussung der Überlebenszeit durch Immunkonjugate

Wie im Versuch zum Tumorwachstum wurde den Versuchstieren am Tag 0 300 µl einer Zellsuspension mit 2×10^7 Neuroblastomzellen zu 50 % intravenös und 50 % intraperitoneal injiziert. Ab Tag zwei wurden insgesamt sechsmal im Abstand von zwei bis drei Tagen 300 µl jeder Testsubstanz intraperitoneal appliziert. Wie im vorherigen Versuch wurden die Tiere täglich beobachtet und zweimal wöchentlich gewogen. Verstarb eine Maus, wurde die Überlebensdauer notiert. Sobald bei einer Maus eindeutige Krankheitszeichen auftraten, wurde sie getötet und die Überlebensdauer notiert.

Die Tiere aus diesem Versuch wurden postmortal nicht mehr untersucht.

5.12.5 Immunzytologische Färbung

Einleitung

Zytozentrifugenpräparate von Tumor- und Organproben sollten auf ihre immunologischen Oberflächeneigenschaften untersucht werden, um ihre Zuordnung zu Neuroblastomzellen und deren Merkmale überprüfen zu können. Die Antigenexpression auf den Tumorzellen wurde mit der APAAP-Methode untersucht. Die Grundlage dieses Verfahrens sind alkalische Phosphatase-anti alkalische Phosphatase-Immunkomplexe (Cordell et al., 1984). Das Substrat für die alkalische Phosphatase ist Fast Red, aus dem ein rotes Reaktionsprodukt entsteht. Gegen die Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin ergibt sich auch bei wenigen positiven Zellen ein gut erkennbarer Kontrast.

Vorbereitung der Proben

Für die Herstellung der Zytozentrifugenpräparate wurden die Röhrchen mit den gefrorenen Organproben im Wasserbad rasch bei 37 °C bis zur Eisschmelze aufgetaut. Der Röhrcheninhalt (etwa 1 ml) wurde mit 4 ml kühlstrankkaltem Neuroblastommedium mit 10 % fetalem Kälberserum bei 1000 U/min 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und der Bodensatz mit dem Medium auf das Volumen gebracht, das für die Konzentrationsbestimmung und die Tierversuche benötigt wurde. Mittels Zytozentrifuge wurden jeweils 100 µl dieser Zellsuspension auf einen Objektträger aufgetragen und sofort zwei Minuten in eiskaltem Aceton fixiert.

Durchführung des Tests

Die acetonfixierten Zellen wurden zunächst 30 min mit je 50 µl 1 % BSA/Tris blockiert. Da mit der APAAP-Methode gearbeitet wurde, mußte eine phosphatfreie Lösung benutzt werden. Nach dem Dekantieren der Blockierlösung wurden je 30 µl des entsprechenden primären Antikörpers aufpipettiert und bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer für 30 min inkubiert.

Als primäre Antikörper dienten: 15/7, ICAM, NCAM, VCAM, PECAM, IGF-1-R, TGF-R, NGF-R, Anti-beta-Tubulin, GFAP, NB 84, NF 68, GD2. Als Negativkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers 0,1 % BSA/Tris verwendet.

Der Test wurde mit einem APAAP Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Inkubation mit der APAAP-Lösung wurde bis zu dreimal für je zehn Minuten wiederholt, um eine intensivere Färbung zu erreichen. Je nach Ausmaß der Farbreaktion inkubierte die Fast Red Substratlösung über eine Dauer von 20 bis 60 Minuten.

Auswertung des Tests

Nach der Einbettung des Präparates mit Glycergel erfolgte die mikroskopische Auswertung der Färbung.

Die Anzahl der gefärbten Zellen wurde folgendermaßen bewertet:

- 0 – 5 % „-“
- 6 – 25 % „+“
- 26 – 50 % „++“
- 51 – 75 % „+++“
- 76 – 100 % „++++“.

5.13 Statistische Auswertung

Die Bearbeitung der Daten erfolgte mit den Programmen Microsoft Word und Microsoft Excel. Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 10.0 für Windows durchgeführt.

Signifikanzniveaus für die Resultate aus den Versuchen zu MTT-Test, Tumorwachstum und Überlebenszeit wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

6 Ergebnisse

6.1 Konjugation von Retinolsäure und einem monoklonalen Antikörper

All-*trans*-Retinolsäure wurde mit der Carbodiimid-Methode an den monoklonalen Antikörper 15/7 gekoppelt. Unter der Einwirkung von EDC als Vermittler der Reaktion entstand am Protein eine aktivierte Carboxylgruppe, an der Retinolsäure über eine Peptidbindung angekoppelt werden konnte. In den ersten Versuchen traten große Verluste des eingesetzten Antikörpers auf (Abb. 4).

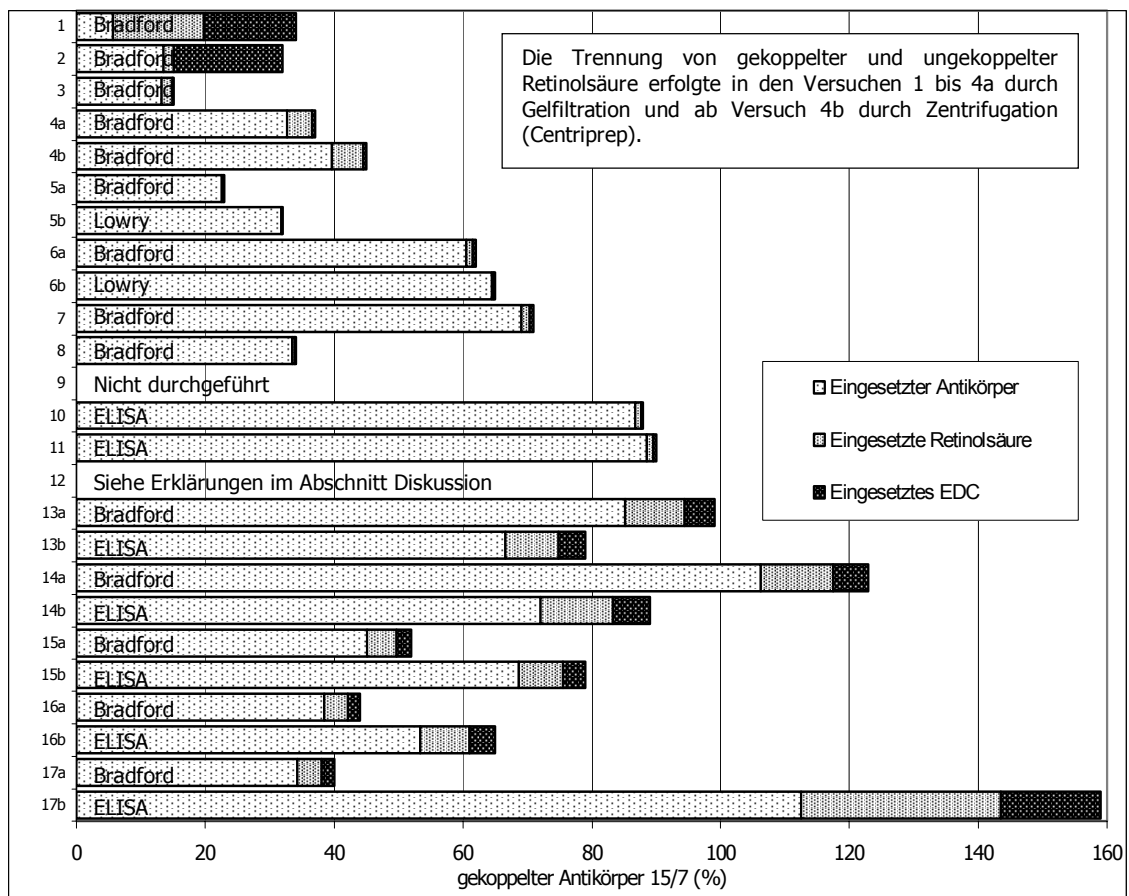


Abb.4: Optimierung der EDC-Kopplung (Ausbeute an Antikörper)

Die Balken zeigen die Ausbeute an gekoppeltem Antikörper 15/7 im Verhältnis zum nativen Antikörper. Jeder Balken setzt sich aus dem Verhältnis von eingesetztem Antikörper, EDC und Retinolsäure zusammen. Dem Diagramm können außerdem die Nummer des Versuches sowie die Methode des Proteinnachweises entnommen werden.

Anfangs lag die Ausbeute bei nur 34 %. Die Menge des eingesetzten EDC wurde reduziert, da bekannt ist, dass bei zu hohen Konzentrationen an EDC das Proteinkonjugat ausfallen kann. Nach deutlicher Reduktion des EDC auf 50 % und in einem weiteren Schritt bis auf 0,5 % der Ausgangsmenge, konnte jedoch eine Ausbeute von ebenfalls nur 32 % beziehungsweise 15 % erzielt werden.

Nach der Trennung der ungekoppelten Retinolsäure vom Antikörper war in der Säule ein Anteil des Konjugates in Form einer gelben Bande sichtbar. Nachspülen der Säule mit Ethanol führte lediglich zu einer geringen Auswaschung, so dass die Ausbeute daraufhin 37 % betrug.

Deshalb erfolgte der Wechsel der Methode zur Trennung mit einem Zentrifugationskonzentrator. Der Cutoff des Filters lag bei etwa 30 kDa, demzufolge genau zwischen dem Molekulargewicht der Retinolsäure mit 0,3 kDa und dem Molekulargewicht des monoklonalen Antikörpers mit etwa 150 kDa. Dadurch konnte auf diese Weise ungebundene Retinolsäure vom Antikörper getrennt werden. Eine Trennung des möglicherweise noch ungekoppelten vom gekoppelten Antikörper konnte mit dieser Methode nicht erfolgen. Da die Kopplung von Retinolsäure an den Antikörper Voraussetzung für die vorliegenden Untersuchungen war, sollte die Retinolsäure vor der Kopplung im Überfluß vorliegen, so dass kein ungekoppelter Antikörper verbleiben würde.

Nach Umstellung der Trennungsmethode konnte eine Antikörperausbeute von 45 % erzielt werden.

Gleichzeitig wurde im Verhältnis zum monoklonalen Antikörper weniger Retinolsäure eingesetzt.

Um für den Tierversuch eine sterile Konjugatlösung verfügbar zu haben, erfolgte nach der Kopplung eine Sterilfiltration. Dabei traten ausgeprägte Antikörperverluste auf (Abb. 5).

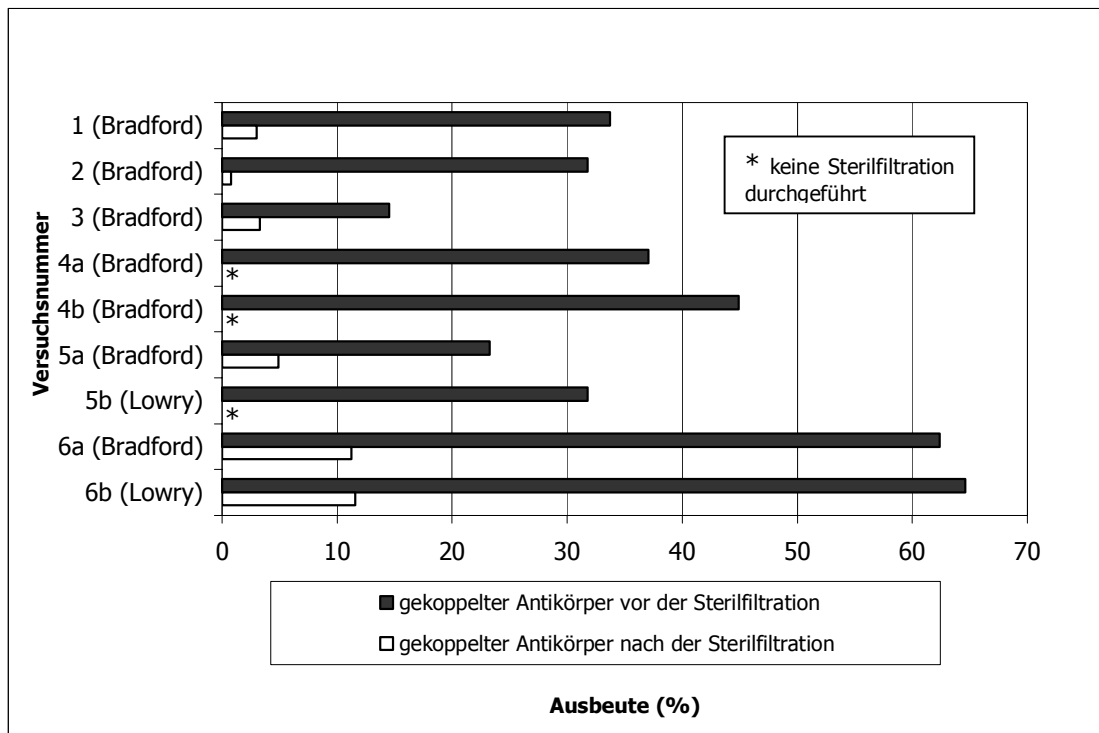


Abb.5: Verluste an Antikörper-Retinolsäure-Konjugat durch die Sterilfiltration

Die Trennung von gekoppelter und ungekoppelter Retinolsäure erfolgte in den Versuchen 1 bis 4a durch Gelfiltration und ab Versuch 4b durch Zentrifugation (Centriprep). Dargestellt ist zu jedem Versuch die Nachweismethode des Antikörpers im Konjugat (Bradford oder Lowry).

Auf diese die Ausbeute vermindernde Filtration konnte verzichtet werden, nachdem für die Kopplung keimfreie Materialien eingesetzt worden waren. Dadurch stand eine deutlich größere Ausbeute an Antikörper in Form des Konjugates für die folgenden Versuche zur Verfügung.

Aufgrund der Wasserunlöslichkeit der Retinolsäure diente zunächst DMSO als Lösungsmittel. Es stellte sich heraus, dass die Retinolsäure in einer DMSO-Lösung einer Konzentration, wie sie in Zellkulturen angewandt werden kann, unzureichend löslich war. Deshalb wurde die Retinolsäure in Ethanol gelöst. Die einmal in Ethanol gelöste Retinolsäure blieb auch bei weiterem Verdünnen in Lösung. Die für die Kopplung benötigte und in Ethanol gelöste Retinolsäure wurde in Konjugationspuffer MES aufgenommen.

Die Löslichkeit der Retinolsäure konnte zusätzlich verbessert werden, indem der pH-Wert der Ethanollösung durch Zugabe von 1 n NaOH in 10 bis 20 μ l-Schritten zunächst angehoben und nach vollständiger Lösung der Retinolsäure der ursprüngliche pH-Wert durch Hinzufügen von 1 n HCl wiederhergestellt wurde.

Ab Versuchsnummer 4 b fand die Trennung mit Hilfe des Filtrationskonzentrators Centriprep statt. Dadurch konnte eine bessere Ausbeute an Antikörper erzielt werden.

Bekannt ist, dass Proteine an Plastikoberflächen binden. Somit war ein Antikörperverlust auch durch dessen Anheften an die Plastikwand der Reaktionsgefäße denkbar. Ab Versuch Nummer Elf wurden deshalb vor der Antikörper-trennung der Reinigungsfilter (Centricon) und der Zentrifugationsfilter (Centriprep) mit dem Ziel des Coating der Gefäßoberfläche mit steriler BSA-Lösung inkubiert. Danach konnte ein weiterer Anstieg der Ausbeute registriert werden. Insgesamt trugen zur Steigerung der Ausbeute an Antikörper-Retinolsäure-Konjugat bei:

- das Coating der Plastikoberfläche des Centriprep mit BSA vor dem Einfüllen der Konjugatlösung,
- die Verwendung von Ethanol als Lösungsmittel für die Retinolsäure,
- das vollständigere Lösen der Retinolsäure nach Änderung des pH-Wertes durch NaOH und HCl,
- die Optimierung des Verhältnisses zwischen eingesetzter Retinolsäure, EDC und monoklonalem Antikörper sowie
- die Trennung von ungekoppeltem und gekoppeltem Antikörper durch einen Zentrifugationsfilter anstatt über eine Gelfiltrationssäule.

6.2 In vitro-Testung der Konjugate

6.2.1 Konzentrationsbestimmung

Da die Proteinbestimmung nach Bradford auf der Reaktion des Farbstoffes Servablue mit bestimmten Aminosäuren basiert, bestand die Gefahr, dass Retinolsäuremoleküle gerade an diesen Stellen angekoppelt wurden und eine Farbreaktion blockieren könnten. Deshalb wurde die Bestimmung der Antikörpermenge mit dem Proteinnachweis nach Bradford mit der Methode nach Lowry verglichen. Beide Nachweise wurden mit dem Standard BSA durchgeführt.

Mittels der Lowry-Methode waren zwar höhere Proteinkonzentrationen als mit der Bradford-Methode nachweisbar, es resultierte jedoch etwa ein ähnliches Verhältnis des nativen zu dem gekoppeltem Antikörper (Abb. 4).

Um die Anlagerung des monoklonalen Antikörpers an die Plastikoberfläche der Zentrifugationsfilter zu reduzieren, wurden die Filter vor der Reaktion mit BSA blockiert. Dadurch wären aber für die Methoden nach Lowry und nach Bradford, die jeweils die Gesamtproteinbestimmung erlauben, und nicht mehrere Proteine in einer Lösung unterscheiden können, falsch hohe Ergebnisse für die Proteinkonzentration zu erwarten. Daraufhin wurde der monoklonale Antikörper spezifisch mit einem ELISA gemessen. Die Ergebnisse dieses Nachweises waren jedoch sehr different. Es ergab sich sowohl eine höhere als auch niedrigere Proteinkonzentration als mit der Messung nach Lowry oder Bradford.

Mittels Extinktionsmessung wurde im Anschluß an die Trennung nach der Kopplung die Konzentration der Retinolsäure in der Konjugatlösung bestimmt (Abb. 6).

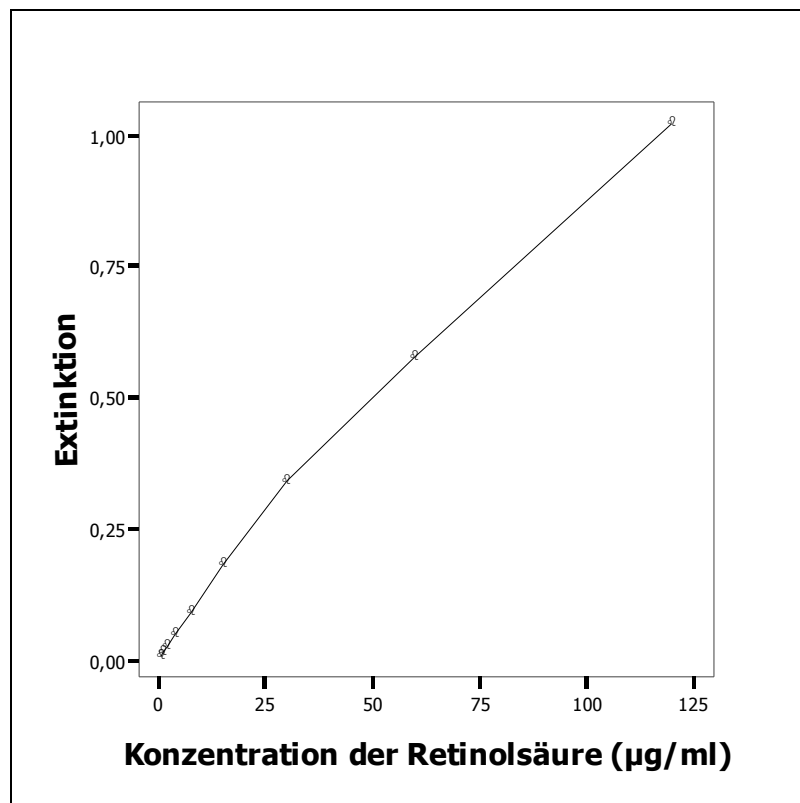


Abb.6: Standardkurve für die Konzentrationsbestimmung der Retinolsäure

Daraus wurde die Menge der Retinolsäure berechnet und ins Verhältnis zu der für den Versuch eingesetzten Retinolsäure gesetzt. Wie vollständig die Anbindung der Retinolsäure an den Antikörper war, geht aus Abb. 7 hervor.

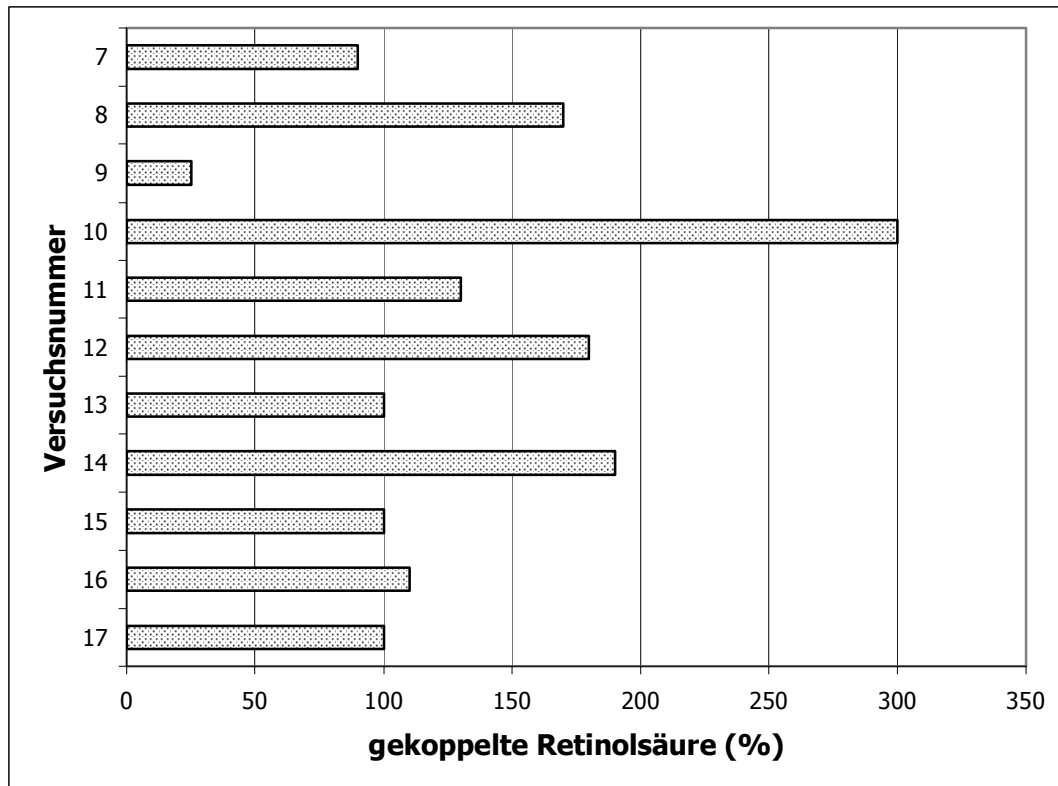


Abb.7: Optimierung der EDC-Kopplung (Ausbeute an Retinolsäure)

Die Balken zeigen die Ausbeute an gekoppelter Retinolsäure im Verhältnis zur eingesetzten Retinolsäure.

Insgesamt lag die Ausbeute im Mittel bei 136 %. Also erfolgte eine vollständige Kopplung der eingesetzten Retinolsäure an den Antikörper.

6.2.2 Bindungsfähigkeit der Konjugate

Ein relevanter Unterschied im Bindungsverhalten an Neuroblastomzellen zwischen dem gekoppelten und dem nativen Antikörper stellte sich nicht heraus (Abb. 8). Durch die Konjugation der Retinolsäure an den Antikörper werden spezifische Bindungsstellen des Antikörpers offenbar nicht blockiert.

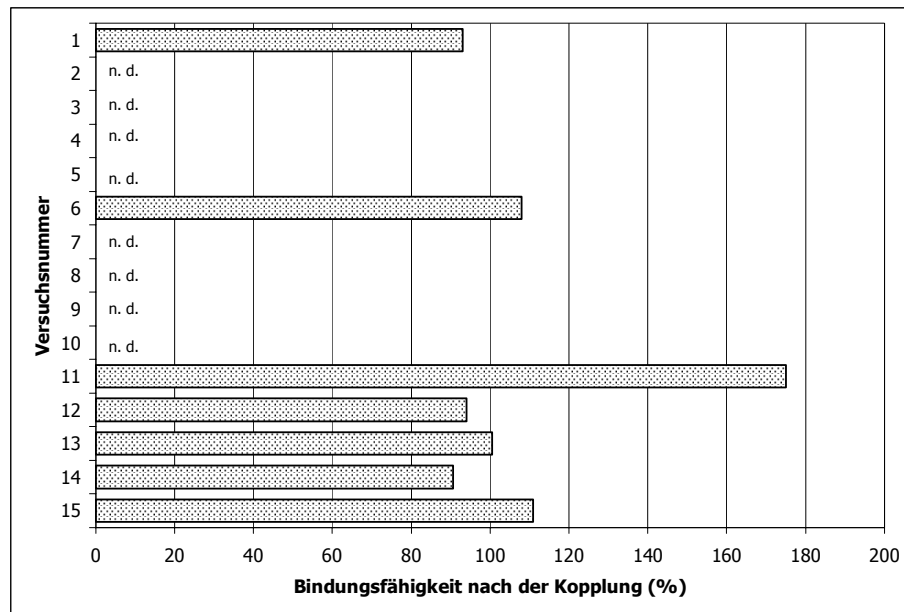


Abb.8: Bindungsfähigkeit der Immunkonjugate

Dargestellt ist das Verhältnis zwischen der Bindungsfähigkeit des Immunkonjugats und des nativen Antikörpers an SK-N-MC-Zellen (n. d. = nicht durchgeführt)

Ziel der Experimente war, die Wirkung der Retinolsäure über monoklonale Antikörper zu vermitteln. Also war die Bindung der Antikörper an Neuroblastomzellen grundlegende Voraussetzung für die Versuche. Durch die Kopplung bestand die Gefahr, dass spezifische Bindungsstellen des Antikörpers mit Retinolsäure besetzt würden und dadurch die Bindungsfähigkeit reduziert würde. Um einzuschätzen, wie stark dieser Einfluß auf die Erkennung des Antigens der Neuroblastomzellen sein würde, wurde die Bindung von nativen Antikörpern und von gekoppelten Antikörpern untersucht.

In einem Zell-ELISA wurde die Extinktion von möglichst gleichen Konzentrationen beider Antikörper als ein Maß für die Antikörperbindung verglichen. Die Konzentrationen der untersuchten Antikörper lagen abhängig vom Versuch bei etwa 0,01 bis 100 µg/ml.

Die Extinktion des Konjugatantikörpers ergab Werte von 93 % bis 175 % im Vergleich zum nativen Antikörper. Der Mittelwert aus allen Versuchen betrug 113 %. Der Unterschied war nicht signifikant.

6.2.3 Beeinflussung des Zellwachstums

Die Antikörper-Retinolsäure-Konjugate hemmten im Vergleich zu allen anderen Proben das Zellwachstum signifikant (Abb. 9).

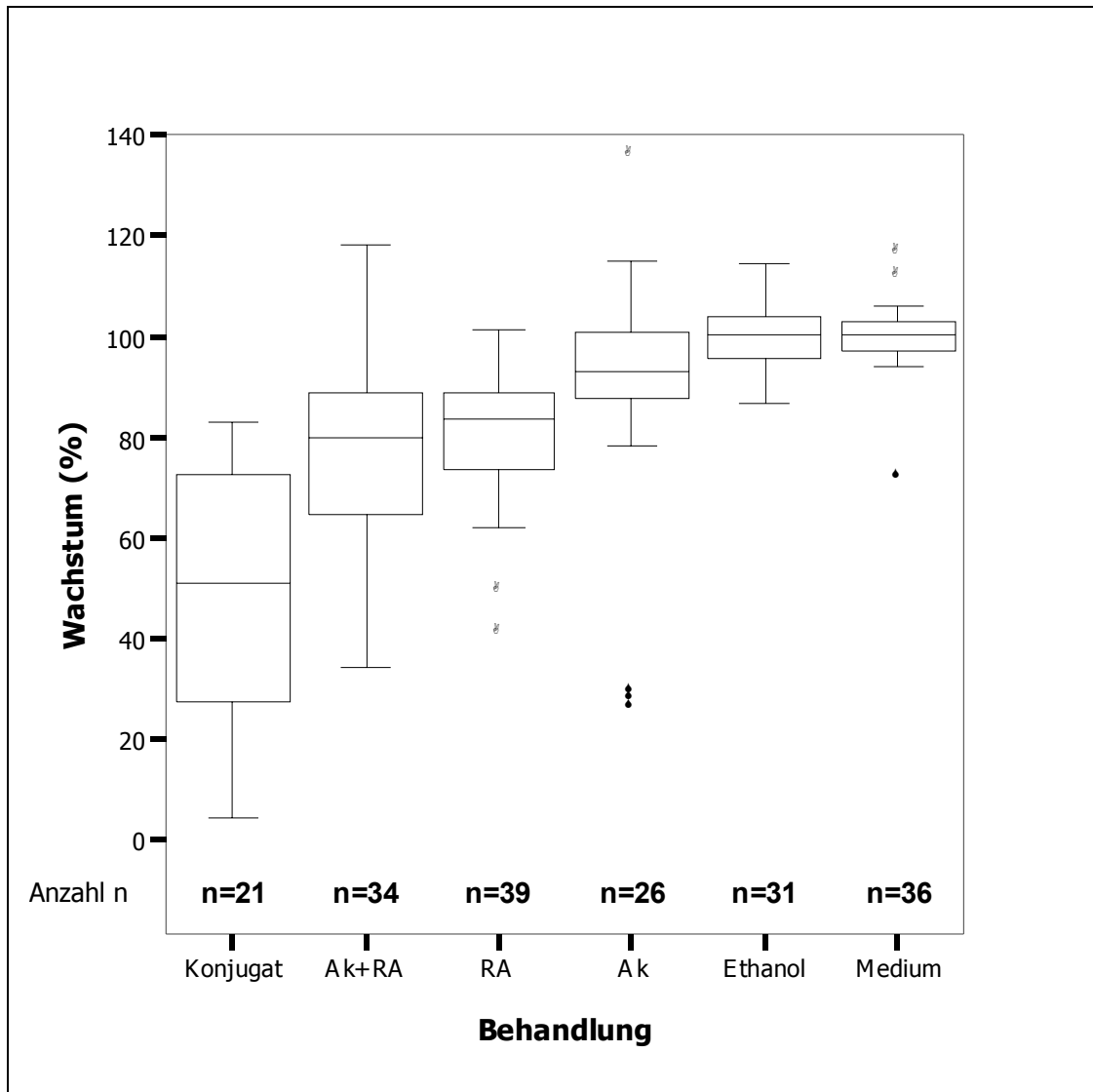


Abb.9: Wachstum von SK-N-MC-Kulturzellen in Abhängigkeit von ihrer Behandlung

MTT-Test.

In den Boxplots sind Mediane dargestellt. Die Box umfaßt den Interquartilbereich mit 50 % aller Werte. Die Linien führen jeweils zum niedrigsten und höchsten Wert, ohne Ausreißer zu berücksichtigen. Ausreißer (o) liegen zwischen 1,5 und 3 Boxlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt. Extremwerte (*) liegen mehr als drei Boxlängen außerhalb der Box. Zusätzlich ist die Anzahl der Einzelwerte (n) angegeben, die in die Berechnung eingehen.

Die Proliferation betrug im Mittel nach Behandlung der Zellkultur mit Konjugat 47 %; mit Antikörper-Retinolsäure-Gemisch (AK+RA) 79 %; mit Retinolsäure (RA) allein 80 %; mit dem monoklonalen Antikörper allein (Ak) 89 %; mit Zellkulturmedium (Medium) 100 %; mit Ethanol als Lösungsmittel der Retinolsäure 100 %. Das Zellwachstum war nach Inkubation mit dem Konjugat im Vergleich zu allen anderen Testsubstanzen signifikant vermindert ($p < 0,001$).

Das Verhalten von Neuroblastomzellkulturen unter dem Einfluß der Immunkonjugate war zu vergleichen mit dem Verhalten der Kulturen unter dem Einfluß von Kontrollsubstanzen. Die Extinktion der Kultur im MTT-Test als Maß mitochondrialer Aktivität, also von Lebensfähigkeit und Wachstum, wurde verglichen. Die Kulturen wurden mit der unverdünnten Konjugatlösung inkubiert. Als Kontrolle dienten gleiche Konzentrationen der anderen Testsubstanzen. Die Ergebnisse wurden in Bezug zur Kontrollkultur mit dem Lösungsmittel der Retinolsäure (Ethanol) oder mit Medium (= 100 %) gesetzt.

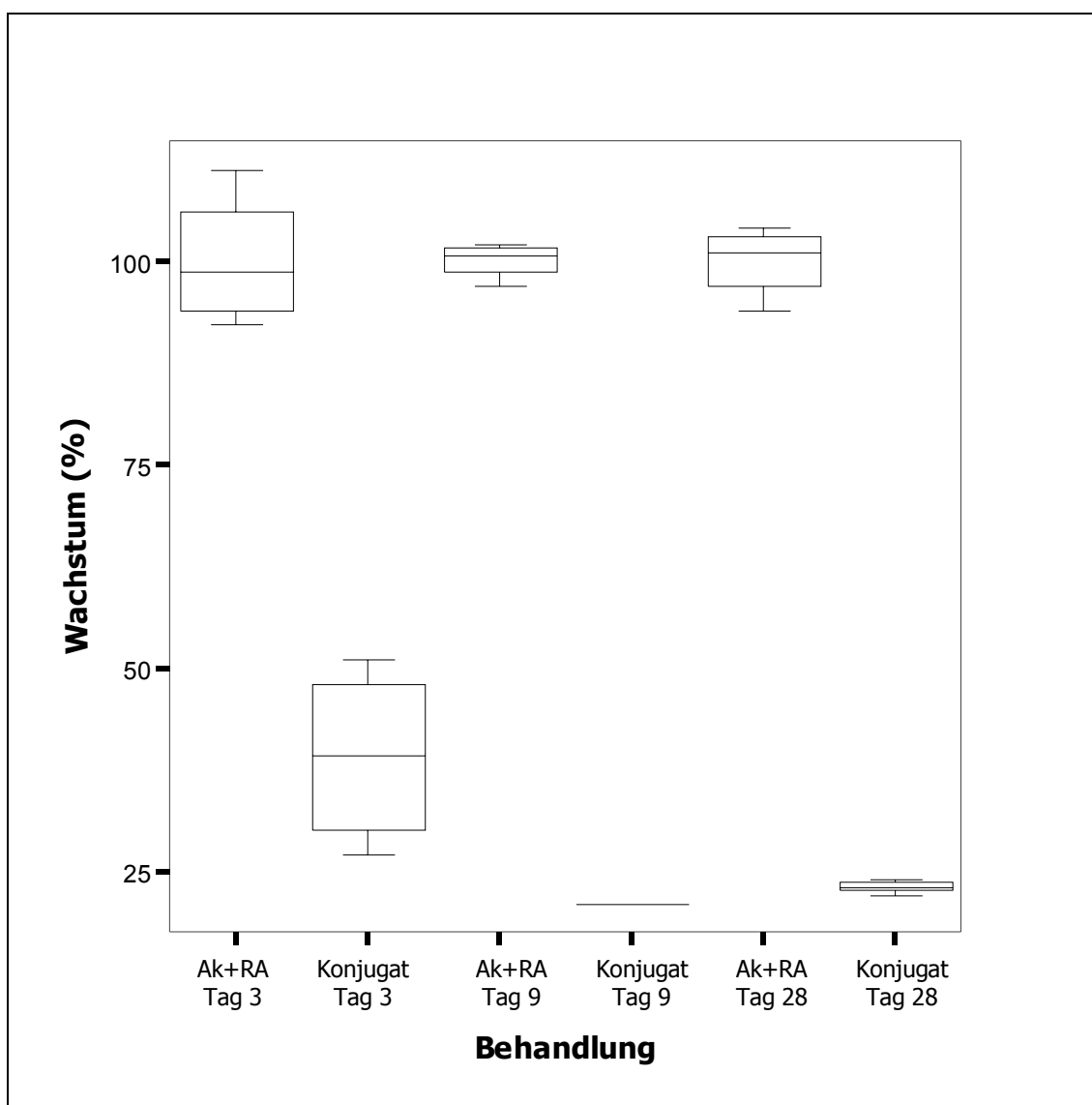


Abb.10: Wachstum von SK-N-MC-Kulturzellen in Abhängigkeit von ihrer Behandlung und von der nach der Kopplung verstrichenen Zeit

MTT-Test drei, neun und 28 Tage nach der Kopplung

Drei, neun und 28 Tage nach der Kopplung wurde erneut ein MTT-Test mit Konjugaten und ein Test mit ungekoppeltem Gemisch aus Antikörper und Retinolsäure angesetzt, um die Stabilität der Peptidbindung im Immunkonjugat zu überprüfen. Dazu wurden erneut die Proliferation nach Behandlung mit dem ungekoppelten Gemisch und die Proliferation nach Konjugatbehandlung miteinander verglichen (Abb. 10).

Es zeigte sich sowohl nach drei, nach neun als auch nach 28 Tagen nach der Kopplung eine eindrucksvolle Proliferationshemmung durch das Konjugat, die deutlich stärker ausfiel als nach Behandlung mit dem ungekoppelten Gemisch.

6.3 Etablierung eines SCID-Maus-Tumor-Modells

Makroskopisch waren die Tumoren regelmäßig erkennbar in Leber, Lymphknoten, Bauchraum (am Peritoneum parietale und Peritoneum viscerales ohne Infiltration in Organe) und Ovar (Abb. 11).

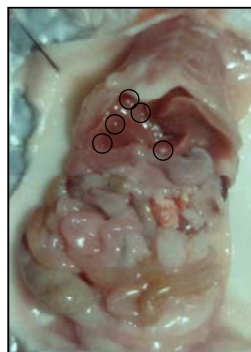


Abb.11: Disseminiertes Neuroblastom mit Lebermetastasen (○)

Als Disseminierung wurde das Anwachsen von Neuroblastomzellen in möglichst vielen Organen angesehen. Die Bezeichnung lokale Tumoren galt für diejenigen, welche nur im Bauchraum, also direkt durch die intraperitoneale Zellapplikation, entstanden waren.

Ein reproduzierbares SCID-Maus-Modell für ein disseminiertes Neuroblastom konnte aufgestellt werden (Tab. 1).

Tabelle 1: Etablierung eines Modells für ein disseminierte Neuroblastom in der SCID-Maus

Anzahl der Mäuse (n)	Versuchs- dauer (Wochen)	Art der Applikation der Tumor- zellen	Zellzahl je Maus (x10 ⁶)	Befallene Organe								
				Leber	Niere	Lunge	Gehirn	Knochenmark	Intraabdominelle Lymphknoten	Dünndarm	Ovar	Zwerchfell
3	4	i.p.	1									
3	5	i.p.	6,7	+					+		+	
				+	+				+		+	
				+					+			
1	4	i.p.	10	+					+	+	+	
1	5			+				+	+		+	
1	5			+				+	+			
3	6	i.v.	5									
2	6	i.v.	30									
2	6	i.v.	50									
1	5							+			+	
1	8					+					+	
1	9						+					
1	12											
1	7	i.p. + i.v.	50	+							+	
1	8			+				+	+		+	
1	12			+					+		+	+

In Lunge, Gehirn und Knochenmark gelang der Nachweis des Tumorwachstums durch Anwachsen der Tumorzellen in der Zellkultur nach Kultivierung von entsprechenden Organproben. Von der Tumordisseminierung waren somit Leber, Lymphknoten, Bauchraum, Lunge, Ovar, Gehirn und Knochenmark betroffen. Der Nachweis der Tumoren gelang nicht regelmäßig in allen Versuchstieren in den gleichen Organen.

Bei alleiniger intraperitonealer Gabe von 1×10^6 Tumorzellen in einem Volumen von 300 μl entstanden keine Tumoren. Nach Erhöhung der Tumorzellzahl auf $6,7 \times 10^6$ fanden sich Tumoren nur lokal im Bauchraum am Peritoneum, an den Nieren, auf der Leberoberfläche und am Zwerchfell. Auch nach Erhöhung der Zellzahl auf 10×10^6 bildeten sich Tumoren nur oberflächlich auf Bauchorganen, eine Disseminierung trat nicht auf.

Deshalb wurde der Weg der intravenösen Applikation gewählt. Bei einer Gesamtzellzahl von 5×10^6 und 30×10^6 traten keine Tumoren auf. Bei 50×10^6 Zellen fanden sich in drei von sechs Fällen Tumoren. In diesen drei Fällen wuchsen aus entsprechenden Organproben in der Zellkultur in einem Fall Tumorzellen aus dem Gehirn an, in einem weiteren Fall aus dem Knochenmark und im dritten Fall aus der Lunge. Außerdem entstanden bei diesen Tieren in zwei Fällen zusätzlich Tumoren am Ovar. Anhand dieses im Organismus verteilten Auftretens der Tumoren, konnte eine Disseminierung gezeigt werden. Da die Tumorentstehung nach intraperitonealer Zellapplikation nur lokal und nach intravenöser Zellapplikation zwar disseminiert aber bei hoher Zellzahl nur bei 50 % der Tiere induziert werden konnte, wurden anschließend intravenöse und intraperitoneale Injektion der Tumorzellen kombiniert. Dazu erhielten die Tiere unmittelbar nacheinander eine Hälfte der Zellsuspension von insgesamt 300 µl intravenös und die andere Hälfte intraperitoneal. Bei 50×10^6 Zellen pro Versuchstier entstanden in allen drei Fällen Tumoren. Diese bildeten sich an Ovar, Leber, abdominalen Lymphknoten, im Bauchraum, am Zwerchfell und im Knochenmark.

Nach intraperitonealer Zellapplikation waren nach vier bis fünf Wochen Tumoren entstanden, an den Mäusen äußerlich an tastbaren Schwellungen oder Allgemeinsymptomen wie stumpfem Fell, Gewichtsverlust, gekräuseltem Fell oder Lähmungen und bei der Präparation der getöteten Mäuse an makroskopischen Tumoren erkennbar. Nach intravenöser Zellapplikation dauerte die Tumorentstehung fünf bis zwölf Wochen. Nach kombinierter intravenöser und intraperitonealer Gabe der Zellen dauerte die Tumorbildung sieben bis zwölf Wochen.

Dieser Versuch war die Grundlage für die nachfolgenden therapeutischen Tierversuche. Dazu wurden insgesamt Untersuchungen an 116 SCID-Mäusen durchgeführt, denen zuvor SK-N-MC-Zellen appliziert worden waren. 78 Tiere wurden präpariert und auf Tumorbefall untersucht. Bei 4 Mäusen war bei der Präparation keinerlei Tumor nachweisbar. Somit war in 95 % der Versuchstiere eine Tumorinduktion möglich.

Dabei traten in 47 Fällen (64 %) Tumoren in der Leber auf, bei 26 (35 %) in der Milz, bei 19 (26 %) in der Niere, bei 19 (26 %) im Herz, bei 25 (34 %) in der Lunge, in keinem Fall im Gehirn und bei 21 (28 %) im Knochenmark.

Als Begleiterscheinung des Tumorbefalls fiel wiederholt eine zum Teil blutige Ascitesbildung auf (Abb. 12).



Abb.12: Blutiger Ascites bei einer SCID-Maus mit Tumoraussaat im Abdomen

Insgesamt konnte die Etablierung eines Modells für ein disseminierte Neuroblastom in der SCID-Maus als erfolgreich und reproduzierbar angesehen werden.

6.4 Therapeutische Versuche / In vivo-Experimente

6.4.1 Letale Dosis der all-*trans*-Retinolsäure

Die therapeutische Dosierung von all-*trans*-Retinolsäure liegt bei Kindern bei 60 mg/m². Zur Bestimmung der letalen Retinolsäuredosis verwendeten wir die zehnfache Menge. Jedes Versuchstier erhielt dadurch 5 mg all-*trans*-Retinolsäure. Alle drei Tiere überlebten (Tab. 2). Bei weiterer Verzehnfachung der Dosis (50 mg/Versuchstier) starb eine Maus von sieben. Somit waren die Mäuse bei der im Tierversuch zu erwartenden Retinolsäuredosis (maximal 30 µg pro Versuchstier) nicht beeinträchtigt.

Tabelle 2: Letale Dosis der Retinolsäure

Applikationsart	Applizierte Substanz	Zahl der Mäuse	Überlebende Mäuse
i. p.	50 mg RA	7	6
i. p.	5 mg RA	3	3
i. p.	10 % Ethanol	6	6

6.4.2 Beeinflussung des Tumorwachstums durch Immunkonjugate

Nach der Konjugatbehandlung lag der Medianwert der Tumormasse je Versuchstier am niedrigsten, die Tumorzahl am zweitniedrigsten. Einige dieser Ergebnisse waren statistisch signifikant.

Abbildung 13 zeigt ein Beispiel für jede Behandlungsform.

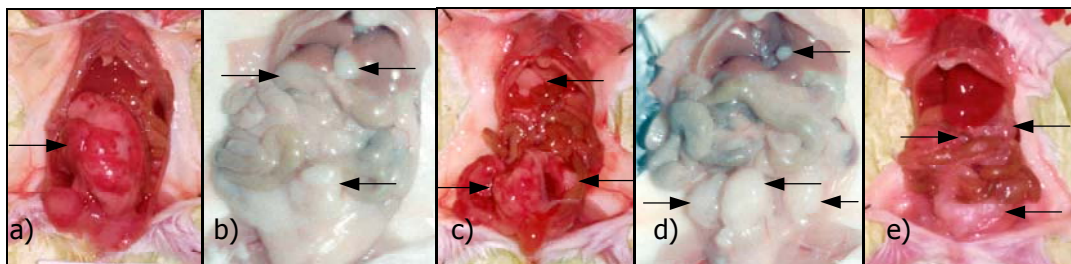


Abb.13: Tumorbefall (➔) nach Behandlung mit Konjugat (a), Ak+RA (b), RA (c), Ak (d), NaCl (e)

Es wurden jeweils 1 bis $2,5 \times 10^7$ Neuroblastomzellen der Linie SK-N-MC in 300 µl NaCl zu 50 % intravenös und 50 % intraperitoneal den Versuchstieren injiziert (Tab. 3). Um in ein frühes Stadium der Tumorentstehung eingreifen zu können, wurden die therapeutischen Testsubstanzen zwei bis drei Tage nach der Tumorzellinjektion appliziert.

Im Verlauf der Untersuchungen der verschiedenen Testsubstanzen wurden 78 SCID-Mäuse präpariert. Von Organproben wurden Zellkulturen angelegt. Dabei wuchsen Zellen in Proben von Leber, Milz, Niere, Herz, Lunge und Knochenmark auf, was für die Disseminierung also den Erfolg des Modells spricht.

Insgesamt wurden acht Tierversuche durchgeführt. Tumorwachstum und Überlebenszeit wurden dabei in getrennten Experimenten untersucht. Tab. 3 gibt einen Überblick über die jeweiligen Versuchsbedingungen.

Die Testsubstanzen wurden im Tierversuch 1 und 2 einmalig, im Tierversuch 3 dreimalig, und ab dem vierten Tierversuch insgesamt sechsmal appliziert.

Tabelle 3: Versuchsbedingungen der Tierversuche

Die beobachtete Variable war entweder die Überlebensdauer (Versuche 6 und 7) der Versuchstiere oder das Tumorwachstum (Tumormasse und Tumorzahl je Tier, Versuche 1 bis 5 und 8) nach Behandlung mit der angegebenen Testsubstanzen.

Nr.	Versuchsdauer (d)	Applizierte Tumorzellen ($\times 10^7$)	Anzahl der Mäuse pro Testsubstanzen (Testsubstanzen je Versuchstier)			
			Konjugat	Ak+RA	RA	Ak
1	34	2,5	6 (Ak 50 μ g; RA 3 μ g)	—	3 (3 μ g)	—
			6 (Ak 5 μ g; RA 0,3 μ g)			
2	38	1	6 (Ak 25 μ g; RA 0,9 μ g)	—	3 (9 μ g)	3 (250 μ g)
			6 (Ak 250 μ g; RA 9 μ g)			
3	22	2	6 (Ak 200 μ g; RA 3 μ g)	—	—	—
4	23	2	6 ²⁾	—	—	—
5	21	2	4 (Ak 119 μ g; RA 23 μ g)	4 (Ak 120 μ g; RA 23 μ g)	4 (23 μ g)	4 (120 μ g)
6	¹⁾	1,8	4 (Ak 127 μ g; RA 25 μ g)	4 (Ak 127 μ g; RA 25 μ g)	4 (25 μ g)	4 (127 μ g)
7	¹⁾	2	4 (Ak 96 μ g; RA 23 μ g)	4 (Ak 100 μ g; RA 20 μ g)	3 (20 μ g)	4 (100 μ g)
8	23	2	4 (Ak 109 μ g; RA 30 μ g)	4 (Ak 110 μ g; RA 30 μ g)	4 (30 μ g)	4 (110 μ g)

Tumorzellen wurden in einem Volumen von 300 μ l zu je 50 % intravenös und intraperitoneal appliziert. Die jeweilige Testsubstanzen wurde in einem Volumen von 300 μ l intraperitoneal verabreicht. Als Vergleich dienten 29 Mäuse, die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt wurden.

¹⁾ Die Versuchsdauer hing im Abschnitt Überleben von der Lebensdauer der Tiere ab und kann dadurch nicht einheitlich für alle Tiere angegeben werden.

²⁾ In Versuch Nr. 4 wurde keine Angabe zur Konjugatmenge gemacht, siehe Diskussion (Erklärung zur Konzentrationsbestimmung bei Kopplung Versuch Nr. 12).

Tiere, die nicht spontan verstarben, wurden bei Auftreten von Symptomen oder nach Ablauf der Versuchsdauer durch Ether getötet und präpariert. Verstorbene Tiere, bei denen bereits Prozesse der Autolyse eingetreten waren, wurden wegen einer reduzierten Aussagekraft über das Vorhandensein von Tumoren oder Metastasen nicht präpariert.

Aus den Tumormaßen wurde das Tumolvolumen berechnet. Aufgeschlüsselt nach Behandlungsmethoden ist der Median des Tumolvolumens in Abb. 14 dargestellt.

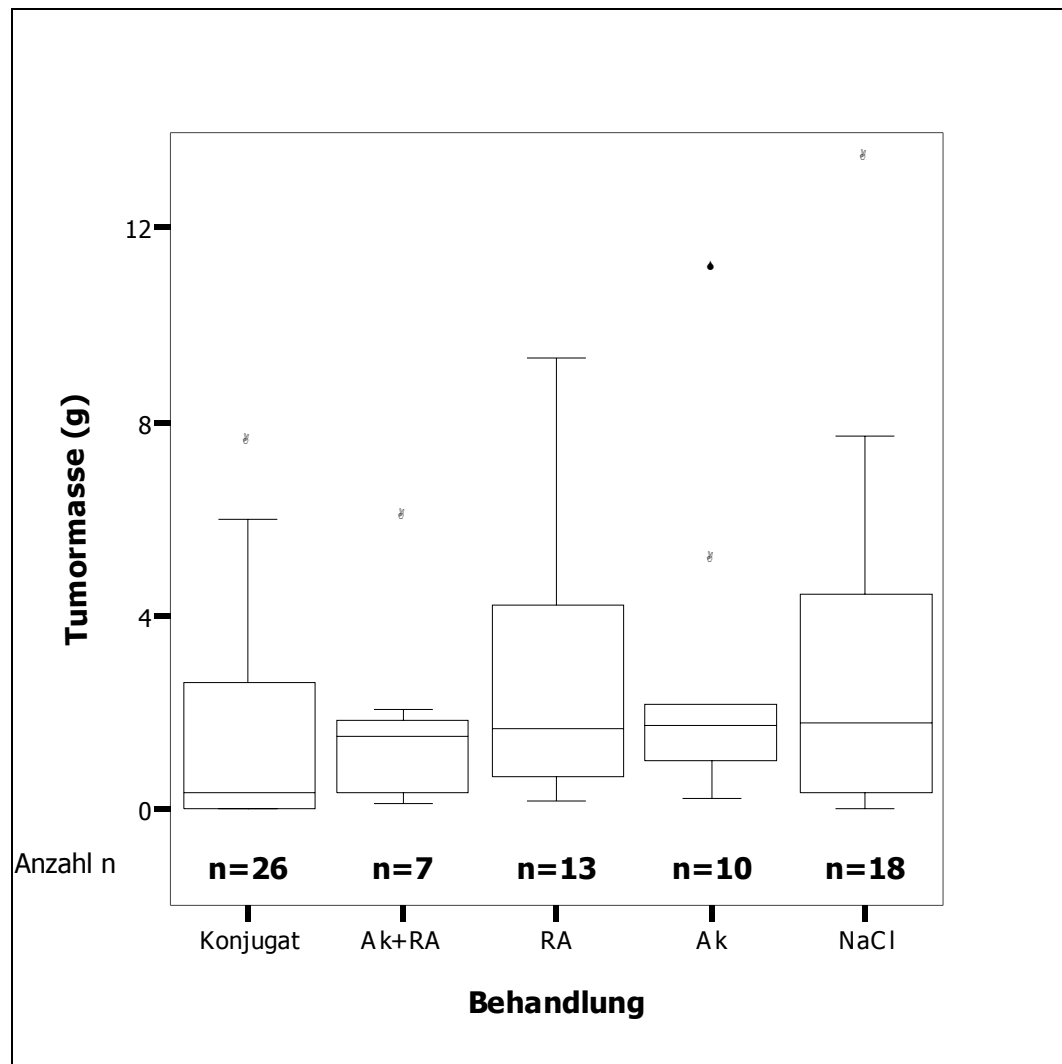


Abb.14: Tierversuch, Tumormasse in Abhängigkeit von der Behandlung

Der Median für die Tumormasse je Versuchstier beträgt nach Behandlung mit Konjugat 0,32 g; dem ungekoppelten Gemisch aus Antikörper und Retinolsäure (Ak+RA) 1,50 g; Retinolsäure allein (RA) 1,66 g; dem monoklonalen Antikörper allein (Ak) 1,71 g; physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) 1,79 g. Zwischen den Ergebnissen nach Konjugat- und nach RA-Behandlung besteht ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

Die niedrigste Tumormasse wurde nach Behandlung mit dem Konjugat ermittelt. Die Streubreite der Ergebnisse innerhalb einer Gruppe mit der gleichen Behandlung ist hoch.

Die Tumorzahl je Versuchstier in Abhängigkeit von der Behandlung geht aus Abb. 15 hervor.

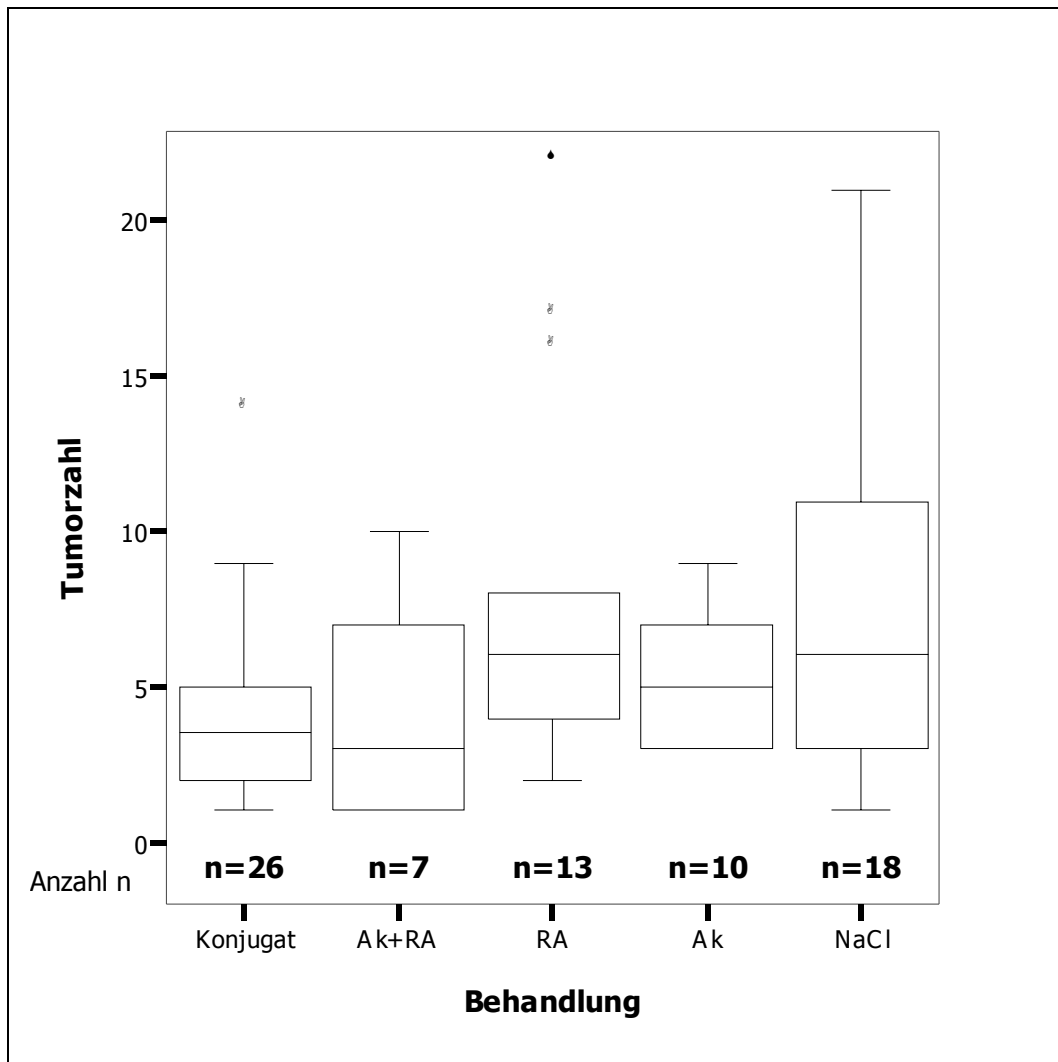


Abb.15: Tierversuch, Tumorzahl in Abhängigkeit von der Behandlung

Der Median für die Zahl makroskopisch sichtbarer Tumoren je Versuchstier beträgt nach Behandlung mit dem Konjugat 3,5; dem ungekoppelten Gemisch aus Antikörper und Retinolsäure (Ak+RA) 3,0; Retinolsäure allein (RA) 6,0; dem monoklonalen Antikörper allein (Ak) 5,0; physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) 6,0. Zwischen den Ergebnissen nach Konjugat- und nach NaCl- sowie nach RA-Behandlung besteht ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

Die niedrigste Tumorzahl mit 3,0 je SCID-Maus lag nach Behandlung mit dem ungekoppelten Antikörper-Retinolsäure-Gemisch vor. Nach Behandlung mit dem Konjugat lag die Tumorzahl bei 3,5.

6.4.3 Postmortale Untersuchung der Versuchstiere

Immunzytologische Färbung / Differenzierungsgrad der Tumorzellen

Verschiedene Differenzierungsantigene konnten erhöht auf der Oberfläche der konjugatbehandelten Tumorzellen nachgewiesen werden (Tab. 4). Dazu zählen ICAM, NCAM, TGF-R und GFAP.

Tabelle 4: Nachweis von Differenzierungsantigenen auf den Tumorzellen in Abhängigkeit von der Behandlung

APAAP-Färbung

	Konjugat	Ak+RA	RA	Ak	NaCl
ICAM	+	-	-	-	-
NCAM	+	-	-	-	-
PECAM	-	-	+	-	-
VCAM	-	-	-	-	+
IGF-R	-	-	-	+	-
TGF-R	++	-	-	-	+
NF 68	-	-	-	-	-
NB 84	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	-
GD 2	n. d.	n. d.	-	n. d.	-
beta-Tubulin	++	+	++	++	+
GFAP	++++	++	++	++	++
Negativkontrolle	-	-	-	-	-

Dargestellt ist der Anteil der gefärbten Zellen nach der jeweiligen Behandlung. Die Anzahl der gefärbten Zellen wurde verschlüsselt mit „-“ für 0 – 5%; „+“ für 6 – 25%; „++“ für 26 – 50%; „+++“ für 51 – 75%; „++++“ für 76 – 100%.

Der Nachweis von NF68 und GD2 gelang im Median bei keiner Gruppe.

Die Negativkontrollen zeigten in keinem Fall eine Anfärbung.

Der Tierversuch Nummer Fünf konnte nicht mit APAAP ausgewertet werden, da die Zellkultur für die mikroskopischen Präparate bakteriell kontaminiert und somit eine Auswertung der Farbreaktion nicht möglich war.

Immunhistochemie

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten von Tumoren, die bei der Präparation der SCID-Mäuse isoliert wurden, zeigt Tab. 5.

Tabelle 5: Immunhistochemie der Tumoren in Abhängigkeit von der Behandlung

	Konjugat	NaCl
Ki67	+++	+++
Chromogranin	++++	++++
Synaptophysin	-	-
GFAP	+++	-
Alpha-Internexin	++++	-
NF	-	-
S100	+++	-

Dargestellt ist der Anteil der gefärbten Zellen nach der jeweiligen Behandlung. Die Anzahl der gefärbten Zellen wurde verschlüsselt mit „-“ für 0 – 5%; „+“ für 6 – 25%; „++“ für 26 – 50%; „+++“ für 51 – 75%; „++++“ für 76 – 100%.

Der Proliferationsmarker Ki67 war nach Konjugatbehandlung unverändert stark exprimiert. Auffallend war sowohl in der Kontrollgruppe, die mit Kochsalzlösung behandelt wurde, als auch nach Konjugatbehandlung, dass es in allen untersuchten Tumoren Areale mit hoher und niedriger Ki67-Exprimierung nebeneinander gab (Abb. 16).

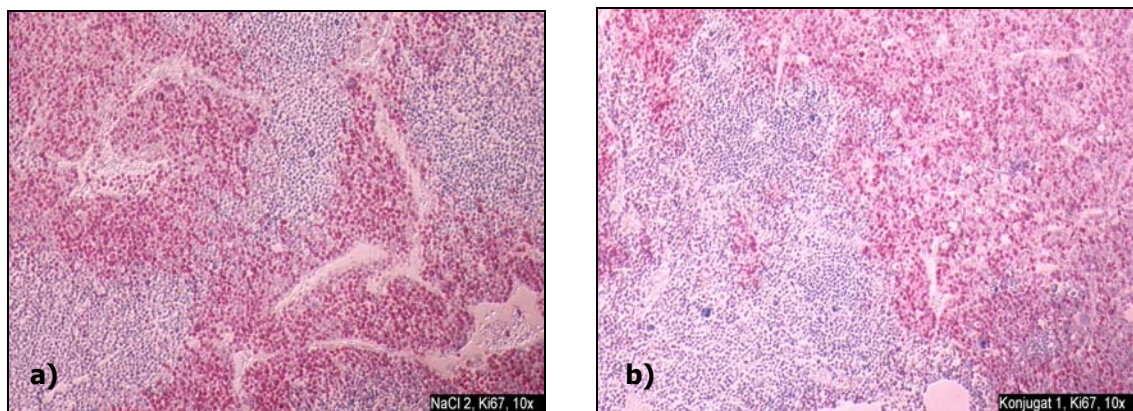
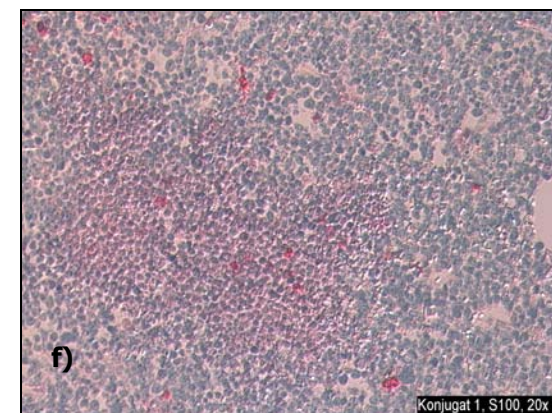
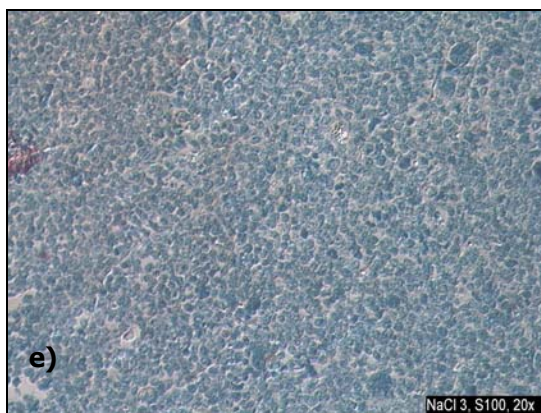
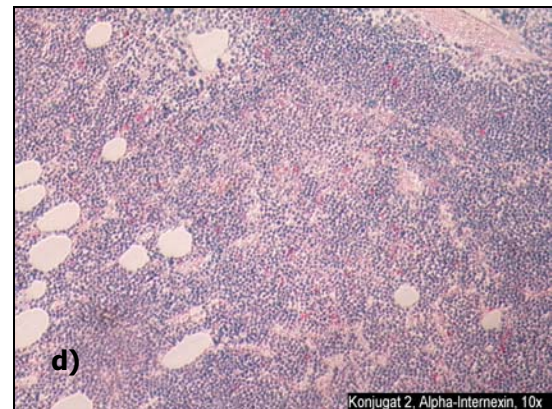
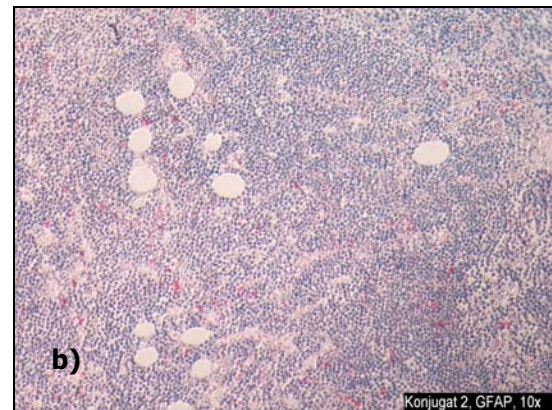
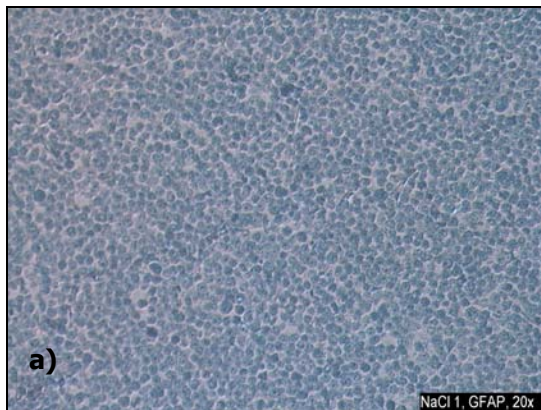


Abb.16: Anfärbbarkeit der Tumorzellen mit Anti-Ki67-Antikörpern nach NaCl-Behandlung (a) und nach Konjugatbehandlung (b)

GFAP, Alpha-Internexin und S100 waren im Vergleich zu Tumoren von kochsalzbehandelten SCID-Mäusen jeweils deutlich stärker nach Konjugatbehandlung auf der Zelloberfläche exprimiert (Abb. 17 a bis f). Die stärkere Ausprägung konnte vor allem in den Tumorarealen mit niedriger Ki67-Reaktivität beobachtet werden (Abb. 17 g und h).



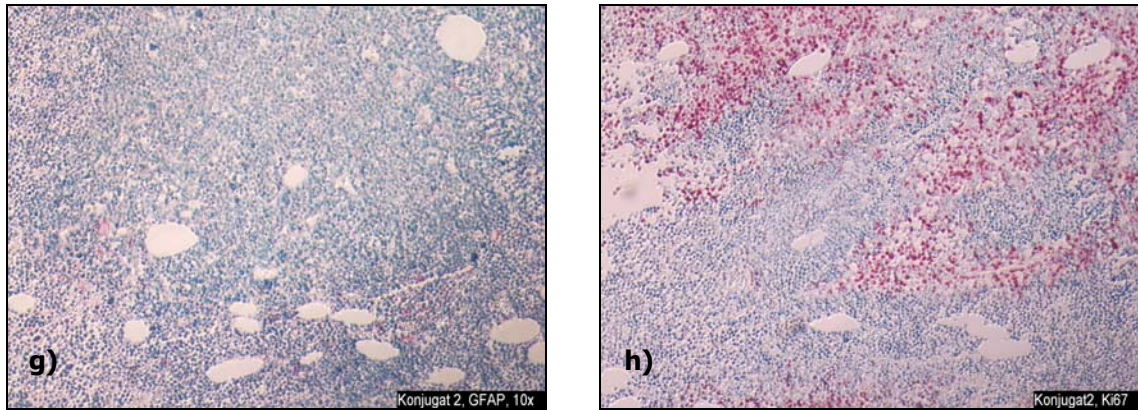


Abb.17: Anfärbbarkeit der Tumorzellen mit Anti-GFAP-Antikörper (a nach NaCl-Behandlung, b nach Konjugatbehandlung), mit Anti-Alpha-Internexin-Antikörper (c nach NaCl-Behandlung, d nach Konjugatbehandlung) und mit Anti-S100-Antikörper (e nach NaCl-Behandlung, f nach Konjugatbehandlung) sowie der Vergleich der Anfärbbarkeit mit Anti-GFAP- (g) und Anti-Ki67-Antikörper (h) im gleichen Schnitt nach Konjugatbehandlung

6.4.4 Beeinflussung der Überlebenszeit durch Immunkonjugate

Die Überlebenszeiten der SCID-Mäuse sind in Form einer Kaplan-Meier-Kurve in Abb. 18 gezeigt. Der Median der Überlebenszeit war nach Konjugatbehandlung nicht niedriger als in den Kontrollgruppen.

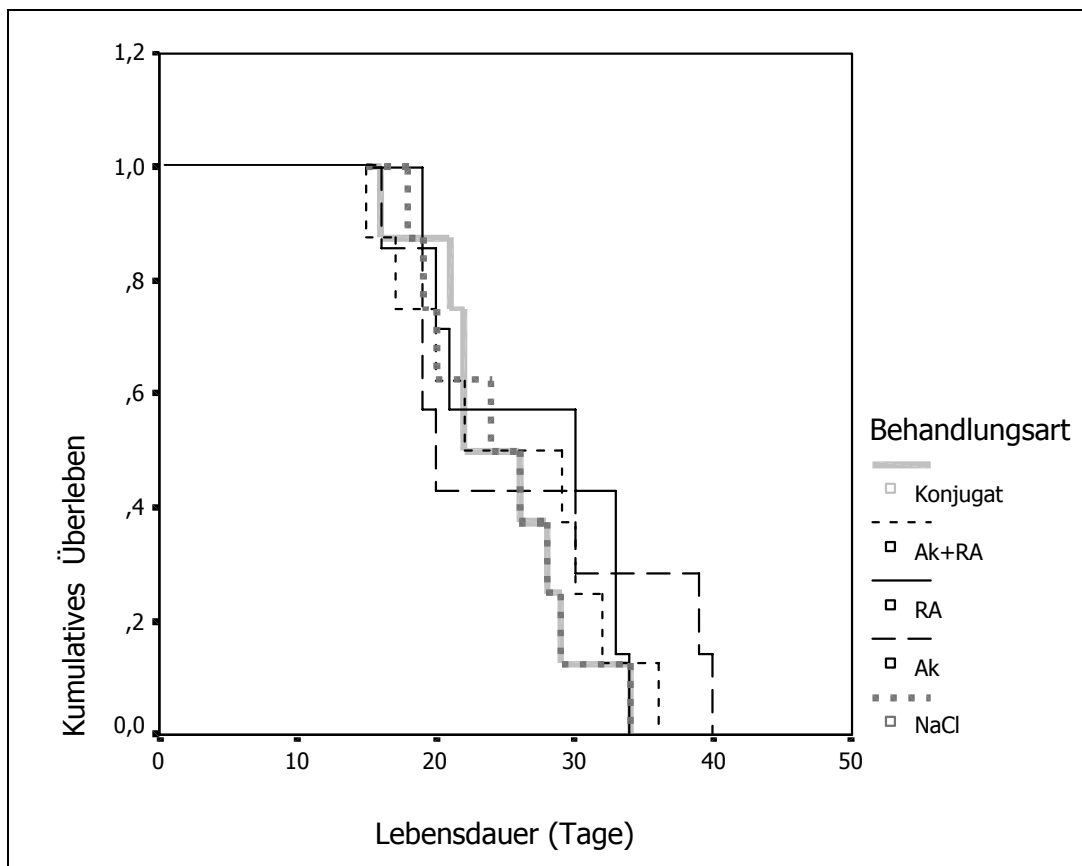


Abb.18: Tierversuch, Überlebensdauer in Abhängigkeit von der Behandlung

Dargestellt sind die Überlebenskurven nach Behandlung der SCID-Mäuse mit den Testsubstanzen. Die Überlebenszeit betrug im Median nach Behandlung mit dem Antikörper-Retinolsäure-Konjugat (Konjugat) 25 Tage (n=8); mit dem ungekoppelten Gemisch aus Antikörper und Retinolsäure (Ak+RA) 25 Tage (n=8); mit Retinolsäure allein (RA) 27 Tage (n=7); mit dem monoklonalen Antikörper allein (Ak) 26 Tage (n=7) und mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) 25 Tage (n=8). Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

7 Diskussion

7.1 Konjugation von Retinolsäure und einem monoklonalen Antikörper

Die Kopplung von all-*trans*-Retinolsäure an einen monoklonalen Antikörper wurde bisher nicht beschrieben.

Die Kopplung konnte so optimiert werden, dass eine gute Ausbeute erreicht wurde und die Bindungsfähigkeit der Antikörper-Retinolsäure-Konjugate an Neuroblastomzellen nachweislich erhalten blieb.

Die Ausbeute von bis zu 80 % konnte nur durch aufwendige Optimierungsversuche erreicht werden. Ursache für Verluste könnte trotz der Blockierung der Oberfläche des Centripreps mit BSA eine Bindung des monoklonalen Antikörpers an die Plastikoberfläche sein. Außerdem entstehen Verluste wahrscheinlich direkt am Filter des Centripreps. Selbst nach ausgiebigem Waschen des Filters mit steriler Kochsalzlösung im Anschluß an die Trennung sprach ein geringer Farbumschlag einer auf den Filter aufgetragenen Bradfordlösung für die Anwesenheit von Proteinen.

Nicht zuletzt ist die Genauigkeit der aus der Standardkurve errechneten Proteinkonzentrationen und damit auch der Ausbeute aufgrund der hohen Verdünnungsschritte bis 1:320 000 bei der Konzentrationsmessung begrenzt.

Bezogen auf die Körperoberfläche war die Dosis der all-*trans*-Retinolsäure in den vorliegenden Versuchen maximal 3,6 mg/m² je Gabe. Sie ist damit niedriger als in der therapeutischen Anwendung bei am Neuroblastom erkrankten Kindern, wo bis zu 60 mg/m² Körperoberfläche je Dosis toleriert werden (Smith et al., 1992). Dadurch dürfte jedoch kein grundsätzlicher Nachteil des Konjugateinsatzes entstehen, da die Retinolsäure über den Antikörper direkt an die Tumorzellen herangeführt, auf diese gezielter wirken müßte und sich nicht wie in der oralen Therapie mit Retinolsäure allein auf den gesamten Körper gleichmäßig verteilt.

Der Retinolsäureanteil im Konjugat hätte am ehesten durch den Einsatz von mehr Retinolsäure im Verhältnis zum Antikörper erhöht werden können. Denn da die Retinolsäure nahezu vollständig an den monoklonalen Antikörper gekoppelt wird, ist naheliegend, dass am Antikörper noch Stellen zur Bindung der Retinolsäure frei sind. Der Retinolsäureanteil ist jedoch gezielt reduziert worden, nachdem hohe Retinolsäurekonzentrationen für die großen Verluste während der Kopplung durch Präzipitation verantwortlich gemacht worden waren.

Die Art der Bindung der Retinolsäure an den Antikörper wurde in unserem Fall nicht untersucht und stattdessen nach der Auswertung vorliegender Publikationen zum Thema angenommen. Bereits 1976 wurde von Jacobsen mittels Spektrophotometrie, Gelfiltration und Gelelektrophorese die kovalente Natur der Bindung zwischen Albumin und Bilirubin nach EDC-Kopplung gezeigt. Nyman et al. (2002) gelang mittels Röntgenkristallographie der Nachweis einer kovalenten Bindung zwischen den beiden Proteinen Profilin und Aktin nach EDC-Kopplung. Muller et al. (2001) untersuchten mit Hilfe der EDC-Kopplung die Bestandteile des mitochondrialen Steroidhydroxylasesystems und fanden Verbindungen zwischen Aminosäuren. Dass die Kopplung zwischen Amino- und Carboxylgruppen stattfindet, wurde von Valuev et al. (1998) gezeigt. In dieser Arbeit wurden sowohl zwischen verschiedenen Proteinmolekülen als auch intramolekulare Vernetzungen beschrieben.

Eine weitere offene Frage ist das Schicksal der Retinolsäure an oder in der Zelle nach der Anbindung des monoklonalen Antikörpers an sein Antigen an der Tumorzelloberfläche. Liegt die Retinolsäure einmal frei außerhalb der Zelle vor, so kann davon ausgegangen werden, dass sie mit Hilfe der CRABPs zum Ort ihrer Wirkung im Zellkern transportiert wird (Noy, 2000). Die Retinolsäure ist durch eine Amidbindung an den Antikörper gebunden. Es wird vermutet, dass die Aktivität von Proteasen, die in hoher Konzentration am Ort eines Tumorgeschehens vorliegen, auch zur Freisetzung der Retinolsäure aus dem Konjugat führt. Im Falle von Mitomycin C und N-succinyl-Chitosan, die durch EDC-Kopplung gekoppelt wurden, konnte in vitro in Mausplasma die graduelle Freisetzung des Mitomycin C gezeigt werden (Kato et al., 2000).

7.2 In vitro-Testung der Konjugate

7.2.1 Konzentrationsbestimmung

Zur Berechnung der Konzentration des Antikörpers vor und nach der Kopplung kamen verschiedene Methoden zum Einsatz. Der Proteinnachweis erfolgte zunächst mit der Bradford-Methode. In den ersten Kopplungsversuchen waren mit dieser Methode hohe Proteinverluste aufgefallen.

Eine denkbare Ursache für die anfangs hohen Proteinverluste nach der EDC-Kopplung waren Blockierungen an Stellen im Protein, die für den Bradford-Nachweis frei sein müßten. Die Lowry-Methode wurde deshalb zum Vergleich eingesetzt. Die relative Ausbeute an Antikörper nach der Kopplung war bei beiden Nachweismethoden etwa gleich. Einerseits könnten die Aminosäuren für den Lowry-Nachweis im gleichen Verhältnis blockiert sein wie die Aminosäuren für den Bradford-Nachweis. Andererseits spricht das Ergebnis auch für einen tatsächlichen Proteinverlust durch die Kopplungs- und Trennungsvorgänge als nur einen scheinbaren Proteinverlust durch blockierte Nachweisgruppen.

Bei der Kopplung von Doxorubicin an murine monoklonale Antikörper mittels EDC-Kopplung wurden ebenfalls Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung wegen Antikörperpräzipitationen und zusätzlicher Verluste bei der Sterilfiltration des Konjugates beschrieben (Sinkule et al., 1991). Burstein und Knapp (1977) berichteten über einen großen Anteil unlöslichen Antikörper-Methotrexat-Konjugates nach EDC-Kopplung, der am ehesten durch Antikörperaggregation verursacht war.

Die Konzentrationsoptima für die Meßmethoden (Bradford, Lowry, Zell-Elisa) machten hohe Verdünnungen der zu vermessenden Lösungen bis 1:320 000 erforderlich. Dabei ist anzunehmen, dass allein die Streuung der Meßwerte und ihre nachfolgende Rückrechnung auf die Originalkonzentrationen zu fehlerhaften Angaben der Proteinkonzentrationen führten.

Die Farbintensität einer Retinolsäurelösung erwies sich als abhängig vom pH-Wert der Lösung. Jedoch lag im Anschluß an die Kopplungsreaktionen durch die Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung als Lösungsmittel jeweils der gleiche pH-Wert wie in der Retinolsäurelösung vor, die zur Aufstellung der Eichkurve für die Retinolsäurekonzentration verwendet wurde. Durch Schwankungen des pH-Wertes ist also kein verfälschender Einfluß auf die Bestimmung der Retinolsäurekonzentration im Konjugat zu erwarten.

Ungeklärt ist jedoch die Frage, ob sich die Extinktion der Retinolsäure durch die Kopplung an den monoklonalen Antikörper ändert. Um eine Antwort zu finden, müßte die Konzentration der Retinolsäure direkt in der Konjugatlösung als Standard dienen und nicht ungekoppelte Retinolsäurelösung.

In einzelnen Fällen fiel während der Optimierung der EDC-Kopplung eine Ausbeute an gekoppeltem Antikörper von über 100 % auf. Scheinbar ergibt sich also nach der Kopplung eine größere absolute Proteinmenge als vor der Kopplung. Dieser Fehler ist am ehesten auf die bereits erwähnten nicht exakten Verdünnungsschritte bei der Proteinbestimmung zurückzuführen. Ungenauigkeiten beim Verdünnen könnten ebenso der Grund sein, dass in manchen Versuchen scheinbar über 100 % der eingesetzten Retinolsäure im Konjugat vorliegen. Darüberhinaus kann die Konzentration der Retinolsäure nur eine gewisse Annäherung sein, da die Absorptionsmessung aus technischen Gründen bei 405 nm und nicht bei der optimalen Absorptionswellenlänge der *all-trans*-Retinolsäure von 340 nm erfolgte. Zumindest kann mit diesem Verfahren eine minimale Interferenz durch Überschneidung mit dem Absorptionsspektrum der Proteine erwartet werden, das um 280 nm liegt.

Die Antikörperausbeute im Versuch 12 erfordert eine eigene Erklärung. In diesem Fall wurde mit der Methode des ELISA eine Ausbeute von 0,08 % erreicht. In diesem Versuch wurde mit 5580 µg eine hohe absolute Menge an Antikörper für die Kopplung eingesetzt. Außerdem sollte der relative Retinolsäureanteil gesteigert werden. Im Vorversuch wurde Retinolsäure im Verhältnis 1:100 zum Antikörper eingesetzt, hier im Verhältnis 1:10.

Die Kombination aus der hohen Konzentration an Retinolsäure und der hohen Menge an Antikörper führte am ehesten im Rahmen der Kopplung und der darauffolgenden Zentrifugation zum Verklumpen des Proteins, so dass es durch die eingesetzten Nachweismethoden nicht erfaßt wurde. Hinweise, dass es nicht zu einem tatsächlichen Verlust kam, sind der positive Retinolsäurenachweis im Konjugat, der ohne die Kopplung an ein Protein im Anschluß an die Zentrifugation nicht möglich wäre, und die deutlichen Ergebnisse bei Testung des Konjugates im MTT-Test und im Tierversuch.

In nachfolgenden Versuchen wurde der Anteil der Retinolsäure wieder reduziert. Um das Risiko einer Präzipitation der Konjugate so gering wie möglich zu halten, muß in Kauf genommen werden, dass die Retinolsäure offenbar nicht im Überschuß vorliegen kann.

7.2.2 Bindungsfähigkeit der Konjugate

Die Bindungsfähigkeit des monoklonalen Antikörpers an die Oberfläche der Neuroblastomzellen, wie sie im Zell-ELISA untersucht wurde, blieb durch die Kopplung der Retinolsäure unbeeinträchtigt. Die Unterschiede in der Bindung waren statistisch nicht signifikant. Auch bei der Kopplung von Indium-111 an monoklonale Antikörper und Antikörperfragmente zum Zweck der Immundetektion von Tumorzellen konnte in ELISA-Tests die vollständig erhaltene Immunreaktivität der radioaktiv markierten Antikörper gezeigt werden (Bedel-Cloutour CH et al., 1991).

In drei Fällen lag der Quotient aus der Extinktion der Konjugatlösung und der Extinktion der nativen Antikörperlösung als Maß für die Bindung an Neuroblastomzellen im Zell-ELISA über 1,0. Das heißt, dass der Konjugatantikörper scheinbar besser an die Neuroblastomzellen bindet als der ungekoppelte Antikörper. Durch die Kopplung der Retinolsäure an den monoklonalen Antikörper könnte höchstens eine Beeinträchtigung der Bindung an Neuroblastomzellen erklärt werden und keine verbesserte Bindungsfähigkeit. Das beschriebene Ergebnis ist am ehesten auf Berechnungen anhand von durch Verdünnungsfehler verursachte ungenaue Werte zurückzuführen.

Die Retinolsäure wurde in den Kopplungsversuchen entsprechend der Nachweismethode vollständig an den monoklonalen Antikörper angekoppelt. Für eine effektivere Kopplung wäre ein deutlicher Überschuß an Retinolsäure wünschenswert. Dadurch könnten möglichst viele Bindungsstellen am Antikörper mit Retinolsäure besetzt werden, an der Zielzelle würde eine entsprechend hohe Konzentration der Retinolsäure entstehen. Für die EDC-Kopplung war im Verlauf der Optimierung jedoch eine Reduktion des relativen Retinolsäureanteils erforderlich, um eine bessere Ausbeute an Kopplungsprodukt zu erreichen. Darüberhinaus liegt die Molekülgröße des Konjugatantikörpers durch die verhältnismäßig kleinen Retinolsäuremoleküle nicht wesentlich über der des ungekoppelten Antikörpers. Native und gekoppelte Antikörper werden dadurch in der Zentrifugation nicht voneinander getrennt. Im Zell-ELISA kann nicht unterschieden werden, ob die Bindung an die Neuroblastomzellen durch Konjugatantikörper oder ungekoppelten Antikörper erfolgt.

Im Nachhinein läßt sich anhand der deutlichen Ergebnisse der in vitro-Versuche zur Zellproliferation vermuten, dass durch die Kopplung ein relativ hoher Anteil der möglichen Bindungsstellen am Antikörper auch tatsächlich mit Retinolsäure besetzt wurde.

7.2.3 Beeinflussung des Zellwachstums

Die eindrucksvollen Ergebnisse des MTT-Tests zeigen, wie deutlich die Proliferation in der Zellkultur nach Konjugatbehandlung im Vergleich zur Behandlung mit den übrigen Proben reduziert wird.

Eine verminderte Proliferation im MTT-Test durch Apoptose nach der Inkubation von SK-N-MC-Zellen mit Retinolsäure konnte bereits vorher gezeigt werden (Voigt et al., 2000). Auch Konjugate aus Antidisialogangliosid und Ricin A hemmten in vitro die Proteinsynthese um 50 % (Gottstein et al., 1994). Ein Immunotoxin aus einem rekombinanten Anti-GD2-Antikörper und dem Pseudomonas-Exotoxin A reduzierte in vitro den Anteil lebensfähiger Zellen der Linie IMR5 um 50% (Tur et al., 2001).

Auch nach Kopplung des Anti-GD2-Antikörpers an Ricin A konnte in vitro die Reduktion lebensfähiger Zellen der Linie IMR5-75 um 50 % gezeigt werden. Die Wirkung hinsichtlich der Proliferationshemmung war von der Dosis des Immunotoxins abhängig und wurde bei einer 3×10^{-9} M Lösung nach 24 Stunden und bei einer 1×10^{-11} M Lösung nach 96 Stunden erreicht (Manzke et al., 2001).

Nach Durchführung des MTT-Test wurden die Zellkulturen bei uns nicht weiterbeobachtet. Es gibt jedoch Berichte, dass die Inhibierung des Zellwachstums vorübergehender Natur ist und nach Absetzen der Retinolsäure wieder zunehmendes Zellwachstum auftritt, was bei SMS-KCNR-Zellen beobachtet wurde. Bei SMS-LHN-Zellen hingegen, die zehn Tage in Kultur mit Retinolsäure inkubiert wurden, waren die morphologische Differenzierung und die verminderte Zellproliferation auch nach Absetzen der Retinolsäure nach sechzig Tagen noch erhalten (Reynolds et al., 1991).

Ein ähnliches Phänomen wurde bei Zellkulturen von SH-SY5Y beobachtet. Hier wurden LG69 (ein selektiver RXR-Agonist), 9-*cis*-Retinolsäure, all-*trans*-Retinolsäure, Ethanol und DMSO verglichen. Fortsätze im Sinne von Neuriten als Zeichen für neuronale Differenzierung bildeten am deutlichsten Zellen nach Behandlung mit all-*trans*-Retinolsäure und 9-*cis*-Retinolsäure und weniger unter LG69 oder den Kontrollsubstanzen. Nach Wegnahme der 9-*cis*-Retinolsäure traten die Zellen in Apoptose. Nach Absetzen von LG69 und all-*trans*-Retinolsäure kehrten sie zu ihrem original undifferenzierten Status zurück (Irving, 1998). In einem anderen Fall fiel ebenfalls die Reversibilität der Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen nach Entfernung der all-*trans*-Retinolsäure auf. Hier wurde zusätzlich die unterschiedliche Reaktion der Zellkultur auf das Inkubationsmuster mit 9-*cis*-Retinolsäure gezeigt. Dabei kam es nach kontinuierlicher Inkubation nicht zu einer Apoptose. Diese ließ sich nur nach fünftägiger Inkubation und anschließender Pause von 13 Tagen nachweisen (Lovat et al., 1997).

Zukünftige Versuche könnten sich mit dem Verhalten von Kulturen von SK-N-MC-Zellen nach der Wegnahme der Retinolsäure beschäftigen.

7.3 Etablierung eines SCID-Maus-Tumor-Modells

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals ein reproduzierbares SCID-Maus-Modell für ein disseminiertes Neuroblastom mit der Zelllinie SK-N-MC entwickelt werden. Nach kombinierter intravenöser und intraperitonealer Injektion der Tumorzellen konnten Neuroblastomzellen in Leber, Ovar, Milz, Lunge, Knochenmark und in abdominalen Lymphknoten der Versuchstiere nachgewiesen werden. In den Versuchen zur Etablierung des Tiermodells bildete sich nach sieben bis zwölf Wochen ein symptomatisches Krankheitsbild heraus. Spätere Versuche zur therapeutischen Testung des Modells ergaben bereits nach drei Wochen einen ausgeprägten Tumorbefall bei den SCID-Mäusen.

Tumormetastasemodelle an der SCID-Maus mit anderen Zelllinien wurden berichtet. Bogenmann (1996) beschrieb ein Modell, das mit der Neuroblastomzelllinie HTLA230 aufgestellt worden war. Nach Injektion von mindestens $0,1 \times 10^6$ Zellen in einem Volumen von 300 µl in eine Schwanzvene bildeten sich abdominale Raumforderungen. Bei jeder Maus mit Tumorbildung konnten auch Lebermetastasen nachgewiesen werden. Bei hoher Tumorlast waren außerdem Absiedlungen in den Nebennieren, Knochenmark und Ovarien nachweisbar, jedoch nie in der Lunge. Die Mäuse überlebten ohne Therapie drei Wochen.

In unseren Experimenten waren mindestens 10×10^6 Zellen zur Tumorinduktion erforderlich. Die Eigenschaften der einzelnen Zelllinien hinsichtlich Aggressivität und Invasivität sind deutlich unterschiedlich, was die Abweichung in der nötigen Gesamtzellzahl und damit auch im injizierten Volumen erklären kann. Der häufige Knochenmarkbefall und die tumoröse Absiedlung in den Ovarien ähnelt unserem Modell. Jedoch gelang uns in keinem Fall der Tumornachweis in den Nebennieren, einer eher typischen Lokalisation des Neuroblastoms beim Menschen, hingegen gelang Tumornachweis in der Lunge.

Ein unserem Modell ähnlicheres Befallsmuster wurde von Thompson et al. (2001) beschrieben, nachdem SCID-Mäusen mindestens 1×10^5 Zellen der Zelllinie NB-1691 in eine Schwanzvene injiziert worden waren. Dabei fielen makroskopische Tumoren in der Leber, den Niere, Ovarien, den Nebennieren, der Milz, Lunge, im Herz, in Lymphknoten und subkutan auf.

Ebenso wie in unseren Versuchen wurde ein oft hämorrhagischer Ascites bei tumorbefallenen Mäusen beschrieben.

In einem SCID-Mausmodell mit der Neuroblastomzelllinie IMR5 konnte nach Injektion von 10×10^6 Zellen bei vier von sechs Mäusen ein Knochenmarkbefall gezeigt werden (Gottstein et al., 1994). In unserem Fall ließ sich in 28 % ein Befall des Knochenmarks nachweisen.

Die Möglichkeiten der intravenösen Injektion waren in unseren Experimenten durch die schwierige Punktion der seitlichen Schwanzvenen der Mäuse limitiert. Bei einem Volumen über 150 μ l kam es häufig zum Platzen der Vene. Die gleiche Zellzahl in einem niedrigeren Gesamtvolumen aufzunehmen, hätte jedoch eine deutlich visköse Lösung mit zusätzlich erschwerten Injektionsbedingungen bedeutet. Durch die kombinierte intravenöse und intraperitoneale Zellinjektion konnte die Gesamtzellzahl zuverlässig appliziert werden.

7.4 In vivo-Experimente

Die ermittelte letale Dosis der Retinolsäure stellt keine Einschränkung des Versuchs dar. Die Dosis, bei der ein Versuchstier verstarb, liegt weit über der im Tierversuch eingesetzten Dosis.

Die Tumormasse je Tier war nach Behandlung mit dem Antikörper-Retinolsäure-Konjugat am niedrigsten. Die Streubreite der Ergebnisse ist jedoch sehr hoch, das Resultat ist statistisch nicht signifikant.

Die Tumorzahl war nach Behandlung mit dem ungekoppelten Gemisch aus Retinolsäure und dem monoklonalen Antikörper am niedrigsten. Nach Konjugatbehandlung war die Tumorzahl je Versuchstier etwas höher. Auch hier war die Streubreite sehr hoch und die statistische Signifikanz entsprechend niedrig. Die reduzierte Tumormasse ohne Einfluß auf die Tumorzahl könnte dafür sprechen, dass das Wachstum der Tumorzellen durch die Konjugatbehandlung verzögert wurde jedoch nicht unterbunden.

Bei den Mäusen, bei denen keinerlei Tumor bei Präparation nachweisbar war, galten die Tumorzellen als nicht angewachsen, da aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht zu erwarten war, dass der Tumor durch die Behandlung völlig zurückgedrängt werden konnte.

Bei Mäusen mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) konnte nach Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper gegen das common ALL Antigen, an den Ricin A-Ketten gekoppelt waren, über vier tumorfreie von fünf behandelten Mäusen berichtet werden. Ein Tier erlitt später einen Rückfall (Hara et al., 1988). An Nacktratten wurde eine signifikante Reduktion der Tumormasse eines 0,3 ml großen subkutanen Tumors aus SH-SY5Y-Zellen nach oraler Therapie mit Retinoiden gezeigt (Ponthan et al., 2001). Dramatische Antitumoreffekte sowohl in SCID- als auch in immunologisch intakten tumortragenden Mäusen (Neuroblastom-Xenograft, GD2 positiv) wurden nach Behandlung mit einem Fusionsprotein aus IL2 und monoklonalen anti-GD2-Antikörpern beobachtet (Sondel, Hank, 1997). Eine Reduktion des Tumors bis um 90 % bei Nacktratten nach intraaortaler Injektion der Tumorzellen konnte durch natürliche humane zytotoxische anti-Neuroblastom-IgM-Antikörper aus dem Serum gesunder Personen erzielt werden (Engler et al., 2001).

Auch bei dem Versuch zur Ermittlung der Überlebenszeit ließen sich die in vitro beobachteten signifikanten Ergebnisse nicht in vivo reproduzieren. Die Überlebenszeit war nach Konjugatbehandlung nicht länger als in den Kontrollgruppen.

Dagegen konnte die Überlebenszeit bei SCID-Mäusen nach intravenöser Tumoretablierung (Zelllinie IMR5-75) durch die intraperitoneale Behandlung mit Immunotoxinen aus anti-GD2-Antikörpern und Ricin A-Ketten signifikant verlängert werden (Manzke et al., 2001). Auch bei SCID-Mäusen mit einem Tumor einer humanen B-Leukämie-Lymphom-Zelllinie BALL-1 war das Überleben nach intraperitonealer Gabe eines Konjugates aus dem monoklonalen Antikörper SN7 und Ricin A-Ketten signifikant verlängert (Kawata et al., 1994). Die Frage, warum derartige eindeutige in vivo-Ergebnisse nicht mit Immunokonjugaten aus dem monoklonalen Antikörper 15/7 und all-*trans*-Retinolsäure erreicht werden konnten, kann nicht endgültig geklärt werden.

Die 9,5fache Anreicherung des Antikörpers 15/7 im Vergleich zu anderen Organen konnte bereits nach Kopplung an I-131 gezeigt werden (Voigt et al., 1997). Andererseits wurde wie bereits erwähnt nach Inkubation mit all-*trans*-Retinolsäure beobachtet, dass Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y wieder in ihren ursprünglichen undifferenzierten Zustand zurückkehren, sobald die Retinolsäure von der Kultur entfernt wird (Irving, 1998). Demzufolge könnte eine Tumorreduktion, die unter den Konjugatapplikationen eintreten würde, in der Zeit zwischen der letzten Konjugatapplikation und der Präparation der Versuchstiere bereits wieder rückläufig gewesen sein.

Eine weitere Limitierung erfahren die Tierversuche sicher durch die niedrige Anzahl an Versuchstieren.

Die Expression einzelner Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktorrezeptoren auf der Zelloberfläche war nach Konjugatbehandlung höher als in den Kontrollgruppen. Dazu zählen ICAM, NCAM und TGF-R. Entsprechend früheren Versuchen wäre eine weitreichendere Zunahme der Expression als Zeichen für einen erhöhten Reifegrad der Tumorzellen zu erwarten gewesen. In vitro war gezeigt worden, dass SK-N-MC-Zellen nach Retinolsäureeinwirkung eine deutlich vermehrte Expression von ICAM, NCAM, PECAM, VCAM und IGF-R aufweisen und vermehrt NF68 exprimieren. NGF und TGF-R blieben etwa unverändert (Voigt et al., 2000). In diesem Maß konnte die Differenzierung der Tumorzellen in den Tierversuchen nicht reproduziert werden.

Zu den bereits erwähnten Problemen kommt außerdem eine Heterogenität der verwendeten Zelllinie, die im Verlauf ein zunehmend entdifferenziertes Wachstum in der Zellkultur zeigte und somit auch ein aggressiveres Wachstum in vivo erklären könnte. Auffallend war auch die insgesamt niedrigere Anfärbbarkeit der Tumorpräparate in den APAAP-Tests in späteren Versuchen. Diese spontane Transformation und steigende proliferative Aktivität von Zellen in der Kultur nach wiederholter Passage wurde von Rubin et al. (1990) an embryonalen Mauszellen beschrieben. Eine epitheliale Hamsterzelllinie zeigte mit zunehmender Passagenzahl ein schnelleres Wachstum und eine höhere Zelldichte in der Kultur (Peiser et al., 1993).

Matsumura und Kawamoto (1994) beschrieben an einer humanen Gliomzelllinie das Phänomen einer steigenden proliferativen Aktivität der passagierten Zellen in Kultur im Vergleich zu den ursprünglichen Tumorzellen. Somit kann eine höhere Aggressivität des Zellwachstums im Verlauf der Versuche eine Ursache für die geringere Beeinflußbarkeit der Tumoren durch die Konjugatbehandlung sein.

Immunhistochemische Untersuchungen von Paraffinschnitten der Tumoren konnten die Differenzierung auslösende Wirkung der Antikörper-Retinolsäure-Konjugate unterstützen. Im Vergleich zu mit kochsalzbehandelten Tumoren war S100 nach Konjugatbehandlung stärker exprimiert. S100-Positivität ist ein Charakteristikum von Schwannzellen sowie deren Vorläuferzellen und eine der Eigenschaften, die bei Neuroblastomen für eine günstigere Prognose spricht (Shimada et al., 1985). Mit zunehmender Reifung eines Neuroblastoms steigt der Anteil an Schwannzellstroma (Shimada et al., 1999a). Auch der immunhistochemische Nachweis von GFAP im Tumor fiel nach der Konjugatbehandlung stärker aus. GFAP wird ebenfalls von Schwannzellen exprimiert und im Rahmen der Reifung des Neuroblastoms hochreguliert (Scarpa et al., 1996). Dafür spricht auch die stärkere Nachweisbarkeit von GFAP in Ganglioneuromen im Gegensatz zu Neuroblastomen und Ganglioneuroblastomen (Molenaar et al., 1990). Alpha-Internexin hingegen, dessen Nachweisbarkeit nach Konjugatbehandlung ebenfalls deutlich anstieg, ist ein neuronenspezifisches Intermediärfilament (Ho, Liem, 1996). Im Verlauf der Tumordifferenzierung nimmt die Immunreaktivität für Alpha-Internexin zu. Somit scheint eine Reifung der Tumoren durch die Therapie mit dem Antikörper-Retinolsäure-Konjugat einzutreten. Erst in einer weiteren Entwicklungsstufe tritt das Intermediärfilament NF auf (Shea, Beermann, 1999). In unserem Fall war NF auch nach Konjugatbehandlung nicht nachweisbar, was offensichtlich für eine unvollendete Tumorzellreifung spricht. Interessant ist, dass Ki67 sowohl mit als auch ohne Konjugatbehandlung sehr stark exprimiert wird. Alle untersuchten Tumoren besitzen jedoch Areale hoher als auch niedriger Ki67-Reaktivität gleichzeitig. Da die Ausprägung von Ki67 den Anteil der proliferierenden Tumorzellen anzeigt (Schluter et al., 1993), wird das Ausmaß der Proliferation im Neuroblastom durch das Konjugat offenbar nicht beeinflusst.

Erwähnenswert ist hierbei, dass die veränderte Exprimierung von Alpha-Internexin, GFAP und S100 vor allem in den Arealen mit niedriger Ki67-Ausprägung zu beobachten war, welches die Tatsache einer erfolgten Differenzierung bestärkt.

Obwohl die Anreicherung des Antikörpers 15/7 im Tumor bereits gezeigt wurde, kann die Tumورpenetration durch Präzipitationen als Folge der Retinolsäurekopplung eingeschränkt sein. Das Problem der Molekülgröße und der niedrigen Tumordurchdringung im Einsatz monoklonaler Antikörper in der onkologischen Therapie wurde bereits beschrieben. Darüberhinaus sind die entsprechenden Antigene auf den Tumorzellen heterogen exprimiert, wodurch sich einzelne Zellverbände der Antikörperwirkung von vornherein entziehen (Weiner, 1999).

Das Tiermodell kann kaum eine Vorhersage treffen, wie toxisch sich der anti-humane monoklonale Mausantikörper im menschlichen Wirt verhalten würde. Außerdem können Antitumoreffekte, die auf immunologischen Prozessen basieren, in experimentellen Systemen wie der SCID-Maus nicht erreicht werden. Die Tumorzellen könnten der Abwehr durch Antigenmodulation, immunphänotypische Heterogenität und einer niedrigen Immunogenität der Tumorzellen entgehen (Bodey et al., 2000).

Eine weitere ernstzunehmende Limitierung von Studien über antikörperbasierte Therapien in SCID-Maus-Tumor-Modellen ist deren Mangel an normalem humanen Gewebe, um einer Kreuzreaktivität und Toxizität der Antikörper auf den Grund gehen zu können. Der Mangel an humaner Mikroumwelt bei den SCID-Maus-Modellen ist auch deshalb ein Verlust, da sie dafür bekannt ist, eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von Tumorwachstum und Metastasierung sowie bei der Antwort auf eine Immuntherapie zu spielen (Bankert et al., 2001).

Wie von Bankert et al. (2001) empfohlen, beschränkte sich unsere Auswertung nicht auf die bloße Messung von Tumolvolumen und Metastasenzahl sondern schloß Veränderungen der immunologischen Tumorzelleigenschaften als Antwort auf die therapeutischen Interventionen ein.

8 Schlußfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals die Kopplung von Retinolsäure an einen monoklonalen Antikörper, den anti-Neuroblastom-Antikörper 15/7, beschrieben. Die überzeugenden Ergebnisse aus den Untersuchungen an SK-N-MC-Zellkulturen und die Resultate aus den Versuchen am selbst etablierten SCID-Maus-Modell sind als Ausgangspunkt für weitere vertiefende Experimente zu sehen.

Die Kopplung von all-*trans*-Retinolsäure und dem monoklonalen Antikörper 15/7 konnte mit der Carbodiimid-Methode erfolgreich durchgeführt werden. Die Bindungsfähigkeit der Antikörper an die Kulturzelllinie SK-N-MC blieb durch die Kopplung unbeeinträchtigt. In vitro konnte durch das Kopplungsprodukt eine ausgeprägte Wachstumshemmung erreicht werden. In vivo zeigte sich am erfolgreich etablierten SCID-Maus-Tumormodell zum Teil eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums, das Überleben der Versuchstiere wurde nicht beeinflußt. Im APAAP-Test und in histochemischen Untersuchungen ließ sich eine stärkere Ausreifung der Tumorzellen nach Behandlung der Versuchstiere mit dem Immunkonjugat zeigen.

Die eindrucksvollen Ergebnisse aus den in vitro-Experimenten ließen sich teilweise in vivo reproduzieren. Diese Resultate sind es wert, unter veränderten Versuchsbedingungen weiter untersucht zu werden. Dazu zählt unter anderem eine größere Versuchstierzahl. Außerdem könnte die Verwendung von Antikörperfragmenten anstelle der nativen monoklonalen Antikörper zu einer besseren Tumorpenetration der Immunkonjugate und einer rascheren System-clearance führen. So wäre das therapeutische Fenster für das in vitro hoch potente Immunkonjugat optimierbar, da das kleinere Molekül rascher von normalen Organen ausgeschwemmt würde.

Zusätzliche Einsichten könnten außerdem gewonnen werden, wenn der Weg der an den Antikörper gebundenen Retinolsäure in die Zelle und in der Zelle genauer definiert wäre.

Neue Erkenntnisse lassen eine zusätzliche Verbesserung der Ergebnisse durch Ersatz der all-*trans*- durch 9-*cis*-Retinolsäure erwarten, die im Gegensatz zur all-*trans*-Form des Moleküls ihre Wirkung über beide zelluläre Retinolsäurerezeptoren (RARs und RXRs) vermittelt und nicht nur über die RARs.

9 Literatur

- Bankert RB, Egilmez NK and Hess SD. Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies. *Trends Immunol* 2001; 22: 386-393.
- Bedel-Cloutour CH, Maneta-Peyret L, Pereyre M and Beziau JH. Synthesis of a monoclonal antibody-indium-111-porphyrin conjugate. *J Immunol Methods* 1991; 144: 35-41.
- Berry CL. Retinoic acid, neoplasia, differentiation and development. *Virchows Arch* 1997; 430: 267-270.
- Berthold F, Hero B. Neuroblastoma: current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. *Drugs* 2000; 59: 1261-1277.
- Blaner WS: Biochemistry and Pharmacology of Retinoids. In: Hong WK and Lotan R (eds.): *Retinoids in Oncology*. Marcel Dekker Inc., New York (1993) S. 1-42.
- Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE and Kaiser HE. Genetically engineered monoclonal antibodies for direct anti-neoplastic treatment and cancer cell specific delivery of chemotherapeutic agents. *Curr Pharm Des* 2000; 6: 261-276.
- Bogenmann E. A metastatic neuroblastoma model in SCID mice. *Int J Cancer* 1996; 67: 379-385.
- Bosma GC, Custer RP and Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983; 301: 527-530.
- Bosma GC, Davisson MT, Ruetsch NR, Sweet HO, Shultz LD and Bosma MJ. The mouse mutation severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16. *Immunogenetics* 1989; 29: 54-57.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Breedveld FC. Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet* 2000; 355: 735-740.
- Burstein S, Knapp R. Chemotherapy of murine ovarian carcinoma by methotrexate-antibody conjugates. *J Med Chem* 1977; 20: 950-952.

- Castleberry RP. Neuroblastoma. Eur J Cancer 1997; 33: 1430-1438.
- Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, Macdonald S, Pulford KAF, Stein H and Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). J Histochem Cytochem 1984; 32: 219-229.
- Dimery IW: Clinical Toxicity of Retinoids. In: Hong WK and Lotan R (eds.): Retinoids in Oncology. Marcel Dekker Inc., New York (1993) S. 127-146.
- Engler S, Thiel C, Forster K, David K, Bredehorst R and Juhl H. A novel metastatic animal model reflecting the clinical appearance of human neuroblastoma: growth arrest of orthotopic tumors by natural, cytotoxic human immunoglobulin M antibodies. Cancer Res 2001; 61: 2968-2973.
- Evans AE: Neuroblastoma. A Historical Perspective 1864-1998. In: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y and Voûte PA (eds.). Neuroblastoma. Elsevier Science B. V, Amsterdam (2000) S. 1-8.
- Evans TRJ, Kaye SB. Retinoids: present role and future potential. Br J Cancer 1999; 80: 1-8.
- Fenaux P, Chomienne C and Degos L. All-*trans* retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Semin Hematol 2001; 38: 13-25.
- Giguere V, Ong ES, Segui P and Evans RM. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. Nature 1987; 330: 624-629.
- Gottstein C, Schön G, Tawadros S, Kube D, Wargalla-Plate UC, Hansmann ML, Wacker HH, Berthold F, Diehl V and Engert A. Antidisialoganglioside ricin A-chain immunotoxins show potent antitumor effects in vitro and in a disseminated human neuroblastoma severe combined immunodeficiency mouse model. Cancer Res 1994; 54: 6186-6193.
- Gross N, Favre S, Beck D and Meyer M. Differentiation-related expression of adhesion molecules and receptors on human neuroblastoma tissues, cell lines and variants. Int J Cancer 1992; 52: 85-91.
- Gura T. Magic bullets hit the target. Nature 2002; 417: 584-586.

- Hafemann B, Ghofrani K, Gattner HG, Stieve H and Pallua N. Cross-linking by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) of a collagen / elastin membrane meant to be used as a dermal substitute: effects on physical, biochemical and biological features in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 2001; 12: 437-446.
- Hansen LA, Sigman CC, Andreola F, Ross SA, Kelloff GJ and De Luca LM. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1271-1279.
- Hara H, Luo Y, Haruta Y and Seon BK. Efficient transplantation of human non-T-leukaemia cells into nude mice and induction of complete remission of the transplanted distinct tumors by ricin A-chain conjugates of monoclonal antibodies SN5 and SN6. *Cancer Res* 1988; 48: 4673-4680.
- Ho CL, Liem RK. Intermediate filaments in the nervous system: implications in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15: 483-497.
- Irving H, Lovat PE, Hewson QC, Malcolm AJ, Pearson ADJ and Redfern CPF. Retinoid-induced differentiation of neuroblastoma: comparison between LG69, an RXR-selective analogue and 9-*cis* retinoic acid. *Eur J Cancer* 1998; 34: 111-117.
- Jacobsen C. Covalent coupling of bilirubin to albumin. *Int J Pept Protein Res* 1976; 8: 295-303.
- Kato Y, Onishi H and Machida Y. A novel water-soluble N-succinyl-chitosan-mitomycin C conjugate prepared by direct carbodiimide coupling: physicochemical properties, antitumor characteristics and systemic retention. *S.T.P. Pharma Sciences* 2000; 10: 133-142.
- Kawata A, Yoshida M, Okazaki M, Yokota S, Barcos M and Seon BK. Establishment of new SCID and nude mouse models of human B leukaemia / lymphoma and effective therapy of the tumors with immunotoxin and monoclonal antibody: marked difference between the SCID and nude mouse models in the antitumor efficacy of monoclonal antibody. *Cancer Res* 1994; 54: 2688 – 2694.
- Khan AA, Villablanca JG, Reynolds CP and Avramis VI. Pharmacokinetic studies 13-*cis*-retinoic acid in pediatric patients with neuroblastoma following bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 39: 34-41.

- Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497.
- Komuro H, Li P, Tsuchida Y, Yokomori K, Nakajima K, Aoyama T, Kaneko M and Kaneda N. Effects of CPT-11 on a highly malignant xeno-transplanted neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 1994; 23: 487-492.
- Lee CR, Grodzinsky AJ and Spector M. The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis. *Biomaterials* 2001; 22: 3145-3154.
- Lippman SM, Lotan R. Advances in the development of retinoids as chemopreventive agents. *J Nutr* 2000; 130: 479S-482S.
- Lovat PE, Dobson M, Malcolm AJ, Pearson ADJ and Redfern CPF. Differential gene regulation by 9-*cis* and all-*trans* retinoic acid in neuroblastoma cells. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36: 135-138.
- Lovat PE, Irving H, Annicchiarico-Petruzzelli M, Bernassola F, Malcolm AJ, Pearson AD, Melino G and Redfern CP. Apoptosis of N-type neuroblastoma cells after differentiation with 9-*cis*-retinoic acid and subsequent washout. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 446-452.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Manzke O, Russello O, Leenen C, Diehl V, Bohlen H and Berthold F. Immunotherapeutic strategies in neuroblastoma: antitumoral activity of deglycosylated ricin A conjugated anti-GD2 antibodies and anti-CD3 x anti-GD2 bispecific antibodies. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36: 185-189.
- Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2264-2279.
- Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB and Reynolds CP. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-*cis*-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* 1999; 341: 1165-1173.
- Matthay KK. Neuroblastoma: a clinical challenge and biologic puzzle. *CA Cancer J Clin* 1995; 45: 179-92.

- Matthay KK. Neuroblastoma: biology and therapy. *Oncology (Huntingt)* 1997; 11: 1857-1866.
- Mey J. Retinoic acid as a regulator of cytokine signaling after nerve injury. *Z Naturforsch[C]* 2001; 56:163-176.
- Molenaar WM, Baker DL, Pleasure D, Lee VM and Trojanowski JQ. The neuroendocrine and neural profiles of neuroblastomas, ganglioneuroblastomas, and ganglioneuromas. *Am J Pathol* 1990; 136: 375-382.
- Moon RC, Rajenda GM and Kandala VNR: Retinoids and Cancer in Experimental Animals. In: Sporn MB, Roberts AB and Goodman DS (eds.): *The Retinoids: biology, chemistry, and medicine*, 2nd Edition. Raven Press, New York (1994) S. 573-596.
- Mora J, Gerald WL, Qin J and Cheung NV. Molecular genetics of neuroblastoma and the implications for clinical management: a review of the MSKCC experience. *The Oncologist* 2001; 6: 263-268.
- Mueller BM, Reisfeld RA. Potential of the scid mouse as a host for human tumors. *Cancer Metastasis Rev* 1991; 10: 193-200.
- Muller EC, Lapko A, Otto A, Muller JJ, Ruckpaul K and Heinemann U. Covalently crosslinked complexes of bovine adrenodoxin with adrenodoxin reductase and cytochrome P450_{scc}. Mass spectrometry and Edman degradation of complexes of the steroidogenic hydroxylase system. *Eur J Biochem* 2001; 268: 1837-1843.
- Murayama A, Suzuki T and Matsui M. Photoisomerization of retinoic acids in ethanol under room light: a warning for cell biological study of geometrical isomers of retinoids. *J Nutr Sci Vitaminol* 1997; 43: 167-176.
- Nelson PN, Reynolds GM, Waldrin EE, Ward E, Giannopoulos and Murray PG. Monoclonal antibodies. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000; 53: 111-117.
- Noy N. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* 2000; 348: 481-495.
- Nyman T, Page R, Schutt CE, Karlsson R and Lindberg U. A cross-linked profilin-actin heterodimer interferes with elongation at the fast-growing end of F-actin. *J Biol Chem* 2002; 277: 15828-15833.

- Ovejera AA, Houchens DP and Barker AD. Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. *Ann Clin Lab Sci* 1978; 8: 50-56.
- Ozkaynak MF, Sondel PM, Krailo MD, Gan J, Javorsky B, Reisfeld RA, Matthay KK, Reaman GH and Seeger RC. Phase I study of chimeric human/murine anti-ganglioside GD2 monoclonal antibody (ch14.18) with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in children with neuroblastoma immediately after hematopoietic stem-cell transplantation: a children's cancer group study. *J Clin Oncol* 2000; 18: 4077-4085.
- Peiser C, Riebe-Imre M, Emura M and Mohr U. Influence of culture passage on growth kinetics, xenobiotic metabolism, chromosomal stability and transformation in a clonal fetal hamster lung epithelial cell line. *Mutat Res* 1993; 289: 281-290.
- Petkovich M, Brand NJ, Krust A and Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 1987; 330: 444-450.
- Ponthan F, Borgström P, Hassan M, Wassberg E, Redfern CPF and Kogner P. The vitamin A analogues: 13-*cis* retinoic acid, 9-*cis* retinoic acid, and Ro 13-6307 inhibit neuroblastoma tumor growth in vivo. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36: 127-131.
- Reynolds CP, Kane DJ, Einhorn PA, Matthay KK, Crouse VL, Wilbur JR, Shurin SB and Seeger RC. Response of neuroblastoma to retinoic acid in vitro and in vivo. *Prog Clin Biol Res* 1991; 366:203-211.
- Rohwedel J, Guan K and Wobus AM. Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues Organs* 1999; 165: 190-202.
- Rubin AL, Yao A and Rubin H. Relation of spontaneous transformation in cell culture to adaptive growth and clonal heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 482-486.
- Scarpa S, Coppa A, Ragano-Caracciolo M, Mincione G, Giuffrida A, Modesti A and Colletta G. Transforming growth factor beta regulates differentiation and proliferation of human neuroblastoma. *Exp Cell Res* 1996; 229: 147-154.

- Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Hero B, Klein G, Sander J, Schwarz K, Treuner J, Zorn U and Michaelis J. Neuroblastoma Screening at one year of age. *N Engl J Med* 2002; 346: 1047-1053.
- Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD and Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993; 123: 513-522.
- Schön D, Bertz J, Görsch B, Haberland J, Ziegler H, Stegmaier C, Eisinger B and Stabenow R. Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland. Berlin: Robert-Koch-Institut; 1999.
- Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV and Roald B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. *Cancer* 1999; 86: 349-363.
- Shimada H, Aoyama C, Chiba T and Newton WA Jr. Prognostic subgroups for undifferentiated neuroblastoma: immunohistochemical study with anti-S-100 protein antibody. *Hum Pathol* 1985; 16: 471-476.
- Shimada H, Nakagawa A. Tumors of the neuroblastoma group. *Int J Clin Oncol* 1999; 4: 123-132.
- Sidell N. Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1982; 68: 589-96.
- Sigma Product Information Sheet all-*trans*-retinoic acid. Sigma, Steinheim.
- Sinkule JA, Rosen ST and Radosevich JA. Monoclonal antibody 44-3A6 doxorubicin immunoconjugates: comparative in vitro anti-tumor efficacy of different conjugation methods. *Tumour Biol* 1991; 12: 198-206.
- Smith MA, Adamson PC, Balis FM, Feusner J, Aronson L, Murphy RF, Horowitz ME, Reaman G, Hammond GD and Fenton RM. Phase I and pharmacokinetic evaluation of all-*trans*-retinoic acid in pediatric patients with cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1666-1673.
- Sondel PM, Hank JA. Combination therapy with interleukin-2 and antitumor monoclonal antibodies. *Cancer J Sci Am* 1997; 3: S121-S127.

- Thompson J, Guichard SM, Cheshire PJ, Richmond LB, Poquette CA, Ragsdale ST, Webber B, Lorsbach R, Danks MK and Houghton PJ. Development, characterization and therapy of a disseminated model of childhood neuroblastoma in SCID mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; 47: 211-221.
- Tur MK, Sasse S, Stocker M, Djabelkhir K, Huhn M, Matthey B, Gottstein C, Pfitzner T, Engert A and Barth S. An anti-GD2 single chain Fv selected by phage display and fused to pseudomonas exotoxin A develops specific cytotoxic activity against neuroblastoma derived cell lines. *Int J Mol Med* 2001; 8: 579-584.
- Turner WJ, Chatten J and Lampson LA. Human neuroblastoma cell growth in xenogeneic hosts: comparison of T cell-deficient hosts, and subcutaneous or intravenous injection routes. *J Neurooncol* 1990; 8: 121-132.
- Valuev IL, Chupov VV and Valuev LI. Chemical modification of polymers with physiologically active species using water-soluble carbodiimides. *Biomaterials* 1998; 19: 41-43.
- Villablanca JG, Khan AA, Avramis VI, Seeger RC, Matthay KK, Ramsay NKC and Reynolds CP. Phase I trial of 13-*cis*-retinoic acid in children with neuroblastoma following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1995; 13: 894-901.
- Voigt A, Berndt A, Lauterbach H, Carlsohn H, Huller M, Stiller KJ, Gottschild D and Zintl F. Radioimmunodetection of neuroblastoma cells with I-131-radiolabelled antibodies. *Cancer Biother Radiopharm* 1997; 12: 187-194.
- Voigt A, Haefer R and Zintl F. Monoclonal antibodies against neuroblastoma. Production and preliminary characterization of their specificity. *J Neuroimmunol* 1993; 43: 125-130.
- Voigt A, Hartmann P and Zintl F. Differentiation, proliferation and adhesion of human neuroblastoma cells after treatment with retinoic acid. *Cell Adhes Commun* 2000; 7: 423-440.
- Watanabe M, Nagai M, Funaishi K and Endoh M. Efficacy of chemically cross-linked antigens for acellular pertussis vaccine. *Vaccine* 2000; 19: 1199-1203.

- Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Semin Oncol* 1999; 26 (Suppl 14): 43-51.
- Wetlaufer DB. Ultraviolet spectroscopy of proteins and aminoacids. *Adv Prot Chem* 1962; 17:378.
- Wyers MC, Phaneuf MD, Rzucidlo EM, Contreras MA, LoGerfo FW and Quist WC. In vivo assessment of a novel dacron surface with covalently bound recombinant hirudin. *Cardiovasc Path* 1999; 8: 153-159.
- Yang LM, Tin-U C, Wu K and Brown P. Role of retinoid receptors in the prevention and treatment of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4: 377-388.

10 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Formel für all- <i>trans</i> -Retinolsäure.....	27
Abb.2: Formel für EDC.....	28
Abb.3: Reaktionsgleichung für die EDC-Kopplung	30
Abb.4: Optimierung der EDC-Kopplung (Ausbeute an Antikörper).....	46
Abb.5: Verluste an Antikörper-Retinolsäure-Konjugat durch die Sterilfiltration	48
Abb.6: Standardkurve für die Konzentrationsbestimmung der Retinolsäure ..	50
Abb.7: Optimierung der EDC-Kopplung (Ausbeute an Retinolsäure).....	51
Abb.8: Bindungsfähigkeit der Immunkonjugate	52
Abb.9: Wachstum von SK-N-MC-Kulturzellen in Abhängigkeit von ihrer Behandlung	53
Abb.10: Wachstum von SK-N-MC-Kulturzellen in Abhängigkeit von ihrer Behandlung und von der nach der Kopplung verstrichenen Zeit	54
Abb.11: Disseminierte Neuroblastom mit Lebermetastasen	55
Abb.12: Blutiger Ascites bei einer SCID-Maus mit Tumoraussaat im Abdomen	58
Abb.13: Tumorbefall	59
Abb.14: Tierversuch, Tumormasse in Abhängigkeit von der Behandlung	61
Abb.15: Tierversuch, Tumorzahl in Abhängigkeit von der Behandlung	62
Abb.16: Anfärbbarkeit der Tumorzellen mit Anti-Ki67-Antikörpern	64
Abb.17: Anfärbbarkeit der Tumorzellen in der Immunhistochemie	66
Abb.18: Tierversuch, Überlebensdauer in Abhängigkeit von der Behandlung	67

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Etablierung eines Modells für ein disseminierte Neuroblastom in der SCID-Maus.....	56
Tab. 2: Letale Dosis der Retinolsäure.....	59
Tab. 3: Versuchsbedingungen der Tierversuche	60
Tab. 4: Nachweis von Differenzierungsantigenen auf den Tumorzellen in Abhängigkeit von der Behandlung	63
Tab. 5: Immunhistochemie der Tumoren in Abhängigkeit von der Behandlung	64

12 Anhang

Rohdaten der Experimente

EDC-Kopplung

Tab. 1: Eigenschaften der Versuchsanordnung für die Optimierung der EDC-Kopplung (* Empfehlung des Herstellers, ¹⁾ pH-Wert-Einstellung mit NaOH und HCl)

Nr. des Versuches	Ak nativ (µg)	RA (µg)	RA gelöst in	EDC (µg)	Proteinnachweis
*		1000-2000	MES	1000	
Trennung durch Gelfiltration					
1	400	1000	DMSO	1000	Bradford
2	400	50	Ethanol	500	Bradford
3	400	50	Ethanol	5	Bradford
4a	410	50	Ethanol	5	Bradford
Trennung durch Zentrifugation (Centriprep)					
4b	410	50	Ethanol	5	Bradford
5a	760	10	Ethanol ¹⁾	5	Bradford
5b	1800	10	Ethanol ¹⁾	5	Lowry
6a	625	10	Ethanol ¹⁾	5	Bradford
6b	1730	10	Ethanol ¹⁾	5	Lowry
7	520	10	Ethanol ¹⁾	5	Bradford
8	1987	20	Ethanol ¹⁾	10	Bradford
9	1540	20	Ethanol ¹⁾	10	Bradford
10	2000	20	Ethanol ¹⁾	10	ELISA
11	4800	50	Ethanol ¹⁾	25	ELISA
12	5580	558	Ethanol ¹⁾	280	ELISA
13a	720	78	Ethanol ¹⁾	39	Bradford
13b	625	78	Ethanol ¹⁾	39	ELISA
14a	3420	360	Ethanol ¹⁾	180	Bradford
14b	2290	360	Ethanol ¹⁾	180	ELISA
15a	7320	740	Ethanol ¹⁾	370	Bradford
15b	7320	740	Ethanol ¹⁾	370	ELISA
16a	6750	650	Ethanol ¹⁾	330	Bradford
16b	4500	650	Ethanol ¹⁾	330	ELISA
17a	7200	800	Ethanol ¹⁾	400	Bradford
17b	2900	800	Ethanol ¹⁾	400	ELISA

Tab. 2: Technische Bedingungen der Versuche zur Optimierung der EDC-Kopplung

Nr.	Ak nativ (µg/ml)	Ak nativ (µl)	Ak nativ (µg)	Ak im Konjugat (µg/ml)	Ak im Konjugat (µl)	Ak im Konjugat (µg)	Ak im Konjugat / Ak nativ (%)	Ak sterilfiltriert / Ak nativ (%)
Trennung durch Gelfiltration								
1	400	1000	400	135	1000	135	34	3
2	400	1000	400	182	700	127	32	1
3	400	1000	400	116	500	58	15	3
4a	1370	600	820	152	1000	152	37	Keine Sterilfiltration
Trennung durch Zentrifugation (Centriprep)								
4b	1370	600	820	184	1000	184	45	Keine Sterilfiltration
5a	1092	700	760	177	1000	177	23	5
5b	2560	700	1800	572	1000	572	32	Keine Sterilfiltration
6a	625	1000	625	353	1100	390	62	11
6b	1730	1000	1730	1016	1100	1118	65	12
7	740	700	520	370	1000	370	71	Keine Sterilfiltration
8	1242	1600	1987	336	2000	672	34	Keine Sterilfiltration
9	2560	600	1540	2500	2000	5000	325	Keine Sterilfiltration
10	1000	2000	2000	880	2000	1760	88	Keine Sterilfiltration
11	1020	4700	4800	867	5000	4335	90	Keine Sterilfiltration
12	1050	5300	5580	0,4	11000	4,4	0,08	Keine Sterilfiltration
13	1200	600	720	1100	650	715	99	Keine Sterilfiltration
	1040	600	625	760	650	495	79	Keine Sterilfiltration
14	1900	1800	3420	470	9100	4200	123	Keine Sterilfiltration
	1270	1800	2290	224	9100	2040	89	Keine Sterilfiltration
15	1830	4000	7320	424	9000	3820	52	Keine Sterilfiltration
	1830	4000	7320	640	9000	5760	79	Keine Sterilfiltration
16	1350	5000	6750	333	9000	3000	44	Keine Sterilfiltration
	900	5000	4500	750	9000	6750	65	Keine Sterilfiltration
17	2400	3000	7200	362	8000	2900	40	Keine Sterilfiltration
	960	3000	2900	637	8000	5100	159	Keine Sterilfiltration

Tab. 3: Einsatz und Ausbeute der Retinolsäure bei der EDC-Kopplung

Nr. des Versuches	RA nativ (µg)	RA im Konjugat (µg/ml)	Konjugat (ml)	RA im Konjugat (µg)	Ausbeute RA (%)
7	10	9	1	9	9
8	20	17	2	34	170
9	20	28	2	56	25
10	20	30	2	60	300
11	50	13	5	65	130
12	558	89	11	980	180
13	78	122	0,65	79	100
14	360	76	9,1	690	190
15	740	84	9	756	100
16	650	77	9	693	110
17	800	102	8	810	100

In vitro-Versuche

Tab. 4: Wachstum von SK-N-MC-Kulturzellen in Abhängigkeit von ihrer Behandlung
MTT-Test nach Inkubation mit der jeweiligen Testsubstanz, gemessen am Tag der Kopplung

Medium (%)	Ethanol (%)	RA (%)	Ak (%)	Ak+RA (%)	Konj. (%)
102,99	94,44	97,42	92,69	67,05	75,25
96,04	104,34	68,77	111,49	63,61	78,86
100,97	101,23	79,94	92,69	62,18	76,45
99,00	95,07	75,64	94,98	64,47	71,62
103,68	107,12	74,21	108,36	62,46	32,18
97,32	97,81	76,79	93,65	64,18	31,62
99,04	100,13	92,18	78,71	83,69	77,55
97,22	98,58	91,89	78,19	92,74	82,85
103,74	101,29	89,63	79,76	88,50	72,45
96,92	102,50	74,25	89,30	76,16	36,64
100,13	102,87	74,25	88,70	74,79	26,94
102,94	94,63	87,95	100,74	73,15	41,38
99,15	104,43	83,83	29,53	89,46	21,55
96,13	104,67	83,05	27,82	87,90	59,06
104,72	90,90	83,64	25,89	81,50	50,75
116,41	102,97	86,03	114,87	33,94	61,70
111,91	93,87	87,31	136,21	54,00	64,15
71,68	103,16	87,68	108,19	53,03	4,16
100,99	105,75	62,42	109,05	53,61	4,49
96,16	97,85	63,13	98,30	118,13	4,32
102,85	96,41	49,37	95,47	117,41	4,49
100,00	107,73	70,65	87,74	113,47	
101,28	92,27	73,55	93,47	86,71	
98,54	99,95	73,55	89,65	100,48	
93,97	99,95	101,26	91,81	91,79	
95,04	99,20	92,10	95,63	83,33	
106,25	100,89	92,46		87,20	
104,96	86,36	65,94		92,83	
99,43	93,39	70,77		84,76	
96,98	114,47	62,08		78,39	
99,62	105,78	40,58		76,56	
103,96		89,08		77,67	
100,96		94,33		76,56	
94,80		94,89		81,74	
101,46		87,20			
102,79		84,51			
		88,77			
		86,92			
		80,07			

Tab. 5: Wachstum von SK-N-MC-Kulturzellen in Abhängigkeit von ihrer Behandlung
MTT-Test nach Inkubation mit der jeweiligen Testsubstanz, gemessen nach drei, acht und 28
Tagen nach der Kopplung

Tag nach Kopplung	Behandlung der Kultur	Proliferation (%)	Median der Proliferation (%)
3	Konjugat	45	39
		33	
		51	
		27	
	Ak+RA	96	99
		111	
		101	
		92	
9	Konjugat	21	21
		21	
		21	
		21	
	Ak+RA	102	100
		100	
		97	
		101	
28	Konjugat	24	23
		23	
		22	
	Ak+RA	102	101
		104	
		94	
		100	

Tab. 6: Tierversuch, Tumormasse und Tumorzahl.

[illegible]

Tab. 7: Tierversuch, Metastasierung.

Metastasierung der Tumoren je Versuchstier in Abhängigkeit von der Behandlung. Die Nummer (x/y) setzt sich zusammen aus der Nummer des Tierversuches x und der Nummer des Versuchstiers y.

Maus	Leber	Milz	Niere	Herz	Lunge	Gehirn	KM	Einzelne Tumoren
<u>Konjugat</u>								
2/1	+		+					+
2/2	+	+		+	+			+
2/3	+							+
2/4								+
2/5	+							+
2/6		+	+	+	+		+	+
3/1								+
3/2	+	+	+		+		+	+
3/3	+		+		+		+	+
3/4	+							+
3/5	+	+	+		+			+
3/6								+
4/1	+							+
4/2								+
4/3	+							+
4/4								+
4/5	+							+
4/6								+
5/1								+
5/2	+							+
5/3								+
5/4								+
8/1	+							+
8/2								+
8/3		+	+	+	+			+
8/4	+	+	+	+	+		+	+
<u>Ak+RA</u>								
5/1								+
5/2	+							+
5/3	+							+
5/4	+							+
8/1								Kein Tumorwachstum
8/2					+		+	+
8/3		+		+				+
8/4		+			+		+	+

Maus	Leber	Milz	Niere	Herz	Lunge	Gehirn	KM	Einzelne Tumoren
<u>RA</u>								
1/1	+	+	+					+
1/2	+	+						+
1/3								+
2/1	+							+
2/2	+		+	+			+	+
2/3	+							+
5/1	+							+
5/2								+
5/3	+							+
5/4								Kein Tumorwachstum
8/1				+	+		+	+
8/2	+	+	+	+	+		+	+
8/3		+			+		+	+
8/4	+	+	+	+	+		+	+
<u>Ak</u>								
2/1	+	+	+	+	+		+	+
2/2								+
2/3	+	+	+	+	+		+	+
5/1								Kein Tumorwachstum
5/2	+							+
5/3	+							+
5/4	+							+
8/1	+	+		+	+		+	+
8/2		+		+	+		+	+
8/3	+	+			+		+	+
8/4		+	+	+	+			+
<u>NaCl</u>								
1/1	+	+						+
1/2	+							+
2/1	+	+	+	+	+			+
2/2	+	+						+
3/1	+	+			+			+
3/2	+		+				+	+
3/3								+
3/4	+							+
4/1	+							+
4/2	+							+
4/3								Kein Tumorwachstum
5/1	+							+

Maus	Leber	Milz	Niere	Herz	Lunge	Gehirn	KM	Einzelne Tumoren
5/2	+							+
5/3	+							+
5/4	+							+
8/1		+	+	+	+		+	+
8/2		+	+	+	+		+	+
8/3				+	+		+	+
8/4	+	+	+	+	+		+	+
ALLE								
78	47	26	19	19	25	0	21	72

„+“ steht zum einen für makroskopisch nachweisbaren Tumor entweder in den genannten Organen oder im Bauchraum, ohne einem speziellen Organ zugeordnet werden zu können, und zum anderen für nicht makroskopisch sichtbaren Tumor jedoch nach zwei Wochen in der Zellkultur angewachsenen Neuroblastomzellen

Tab. 8: Überlebensdauer der Versuchstiere.

Überlebensdauer je Versuchstier in Abhängigkeit von der Behandlung. Die Nummer (x/y) setzt sich zusammen aus der Nummer des Tierversuches x und der Nummer des Versuchstiers y.

Konjugat		Ak+RA-Gemisch		Retinolsäure		Antikörper		NaCl	
Nr.	Überleben (d)	Nr.	Überleben (d)	Nr.	Überleben (d)	Nr.	Überleben (d)	Nr.	Überleben (d)
6/1	16	6/5	22	6/17	19	6/9	20	6/13	20
6/2	22	6/6	20	6/18	20	6/10	19	6/14	18
6/3	21	6/7	15	6/19	21	6/11	16	6/15	24
6/4	22	6/8	17			6/12	19	6/16	19
7/9	28	7/5	32	7/1	30	7/17	39	7/13	28
7/10	29	7/6	29	7/2	34	7/19	40	7/14	29
7/11	34	7/7	30	7/3	33	7/20	30	7/15	34
7/12	26	7/8	36	7/4	33			7/16	26

Dank

Herrn Professor Zintl gilt mein Dank für die Vergabe des spannenden Themas dieser Doktorarbeit.

Frau Dr. Voigt stand mir mit ihrer reichen Erfahrung jederzeit zur Seite. Ihr danke ich ganz besonders herzlich für die engagierte Unterstützung bei dieser Arbeit.

Bei der deutschen Forschungsgemeinschaft bedanke ich mich für die Förderung des Projektes, in dessen Rahmen diese Arbeit erstellt wurde.

Den Mitarbeitern des hämatologischen Labors der Kinderklinik bin ich sehr dankbar für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die unkomplizierte Hilfe, die ebenfalls zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

In den Dank eingeschlossen sind Prof. Kosmehl und Dr. Berndt neben anderen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts unserer Universität, die mich großzügig bei der Erstellung und Auswertung der immunhistologischen Präparate unterstützten.

Dr. Günther, Herrn Dix und Frau Schorr vom Institut für Versuchstierkunde danke ich sehr für die Betreuung der Versuchstiere und die praktische Unterstützung bei den Tierversuchen.

Ein spezieller Dank gilt meinen Kollegen, deren Rücksicht und Verständnis einen großen Anteil an der Realisierung dieser Doktorarbeit haben.

Insbesondere bedanke ich mich nicht zuletzt bei meinen Eltern für die liebevolle und geduldige Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Conny Schlick
Geburtsdatum: 22.05.1975
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt

Schulbildung

09/1981 – 08/1991 POS, Chemnitz
09/1991 – 06/1993 Gymnasium, Chemnitz
29.06.1993 Abitur

Studium der Humanmedizin

10/1993 – 08/1996 Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/1996 – 08/1997 University College London, Großbritannien
10/1997 – 09/2000 Friedrich-Schiller-Universität Jena
16.11.2000 Staatsexamen

Berufstätigkeit

01/2001 – 06/2002 Ärztin im Praktikum, Kinderklinik Jena
seit 01.07.2002 Ärztin in Weiterbildung, Kinderklinik Jena

Jena, 25. November 2002

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Dr. Voigt aus dem Hybridomlabor der Kinderklinik, Prof. Kosmehl und Dr. Berndt vom Pathologischen Institut unserer Universität.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 25. November 2002